

Synthese und Charakterisierung substratanaloger Inhibitoren der Serinproteasen Matriptase und Kallikrein 7

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Alexander Maiwald
aus Lutherstadt Wittenberg
Marburg/Lahn 2017

Erstgutachter: **Prof. Dr. Torsten Steinmetzer**
Zweitgutachter: **Prof. Dr. Andreas Heine**

Eingereicht am **05.06.2017**

Tag der mündlichen Prüfung am **31.07.2017**

Hochschulkennziffer: **1180**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Torsten Steinmetzer am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Januar 2012 bis Juli 2015 durchgeführt.

„Quare verbis parcam? Gratuita sunt!“

Seneca d. J.

Gewidmet meiner Mutter Heidrun Maiwald

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung.....	1
1.1 Matriptase	1
1.1.1 Struktur und Aktivierung.....	2
1.1.2 Substrate und ihre Bedeutung für die Cancerogenese.....	4
1.1.3 Krebserkrankungen epithelialer Gewebe	6
1.1.4 Arthrose	7
1.1.5 Natürliche Hemmstoffe und Derivate	7
1.1.6 Niedermolekulare synthetische Matriptaseinhibitoren	9
1.2 Kallikrein 7	22
1.2.1 Substratspezifität	22
1.2.2 Struktur	23
1.2.3 Aktivierung	27
1.2.4 Biologische Funktion	29
1.2.5 Funktion bei Erkrankungen	29
1.2.5.1 Netherton-Syndrom	30
1.2.5.2 Atopische Dermatitis.....	30
1.2.5.3 Krebserkrankungen	30
1.2.6 Hemmstoffe des KLK7	31
1.2.6.1 Natürliche Inhibitoren	31
1.2.6.2 Synthetische Inhibitoren	34
2 Ziel der Arbeit	42
3 Ergebnisse und Diskussion	43
3.1 Matriptase	43
3.1.1 Substrate der Matriptase.....	43
3.1.2 Entwicklung neuer substratanaloger Matriptaseinhibitoren	44
3.1.3 Weitere Inhibitoren ohne P4-Rest	50
3.1.4 Inhibitoren mit P4-Rest.....	53
3.1.5 Substratanaloger Inhibitor basierend auf der Aktivierungssequenz	55
3.1.6 Fazit	57

3.2 Kallikrein 7	58
3.2.1 Substrate des KLK7.....	58
3.2.2 Screening vorhandener Inhibitoren.....	60
3.2.3 Modifizierung der P1-Position	63
3.2.4 Modifizierung der P3-Position	67
3.2.5 Untersuchungen zur Position P2.....	71
3.2.6 Modifizierung der P4-Position	73
3.2.7 Selektivität der Verbindungen	75
3.2.8 Synthese eines zyklischen Inhibitors.....	81
4 Zusammenfassung und Ausblick	83
4.1 Matriptase	83
4.2 Kallikrein 7	84
5 Experimenteller Teil	86
5.1 Material und Methoden	86
5.1.1 Material.....	86
5.1.2 HPLC-Messungen	86
5.1.2.1 Analytische HPLC.....	86
5.1.2.2 Präparative HPLC.....	86
5.1.3 Lyophilisierung	87
5.1.4 Massenspektrometrie	87
5.1.5 NMR	87
5.1.6 Dünnschichtchromatographie	87
5.2 Enzymkinetische Messungen.....	88
5.2.1 Matriptase.....	88
5.2.2 Thrombin.....	89
5.2.3 Faktor Xa	89
5.2.3.1 Berechnung der K_i -Werte aus IC_{50} -Bestimmungen.....	90
5.2.4 Kallikrein 7.....	91
5.2.4.1 Untersuchung von Substraten	91
5.2.4.2 Bestimmung von Restaktivitäten	92
5.2.4.3 Bestimmung der K_i -Werte aus IC_{50} -Bestimmungen.....	92
5.3 Synthese der Intermediate	93

5.3.1 Synthese der Bausteine Ala-4-Amba und Pro-4-Amba.....	93
5.3.2 Synthese Boc-geschützter Aminosäuren	97
5.3.3 Synthese und Schutz der racemischen Homoaminosäuren	99
5.3.4 Synthese des Bausteines H-d-N(EtO-CM)hPhe-Ala-OH	104
5.3.5 Synthese des Bausteines Boc-D/L-hAla(piperid(N-Boc)-2-yl)-OH.....	106
5.3.6 Synthese des Bausteines Bzls-d-Arg-Pro-OH × HCl	107
5.3.7 Synthese des Bausteines 4-Aminomethylbenzoesäureamid × HCl	109
5.3.8 Synthese des Bausteines 3-Chlor-4-Hydroxybenzylamin	110
5.3.9. Synthese von Cyclohexylsulfamoylchlorid	111
5.3.10 Synthese von Bausteinen des Typs Pro-Amb(X)	111
5.3.11 Synthese der Bausteine des Typs P2-AMBCB	112
5.3.12 Bausteine des Typs R-Sulfonyl-P3-OH.....	116
5.3.13 Synthese des Bausteines Bzls-d-hPhe-Hyp(Bzl)-OH.....	124
5.3.14 Bausteine des Typs H-Pro(R)-ABMCB	125
5.3.15 Bausteine des Typs P4-P3-Pro(4S-NH ₂)-OH	126
5.3.16 Bausteine des Typs P4-P3-Pro(4S-NH(R))-OH	134
5.3.17 Bausteine zur Darstellung eines zyklischen Inhibitors.....	140
5.3.18 Synthese der AMC-Bausteine	146
5.4 Synthese der Inhibitoren	152
5.4.1 Inhibitoren der Matriptase	152
5.4.1.1 Synthese der Inhibitoren des Typs H-P3-Ala-Amba	152
5.4.1.2 Synthese der Inhibitoren des Typs H-P3-Pro-Amba.....	154
5.4.1.3 Synthese substratanaloger Inhibitoren mit P4-Rest	156
5.4.1.4 Synthese von H-N(Ethoxycarbonylmethyl)-D-hPhe-Ala-4-Amba	157
5.4.1.5 Synthese des Hemmstoffs H-Arg-Gln-Ala-4-Amba	158
5.4.2 Synthese der Inhibitoren des Kallikrein 7	160
5.4.2.1 Synthese der Inhibitoren des Typs Bzls-D-Arg-Pro-P1.....	160
5.4.2.2 Synthese der Inhibitoren des Typs Bzls-D-hPhe-Pro-P1	162
5.4.2.3 Synthese der Inhibitoren des Typs Bzls-D-hPhe-P2-AMCB	163
5.4.2.4 Synthese der Inhibitoren des Typs Bzls-P3-Pro-AMCB	165
5.4.2.5 Synthese der Inhibitoren des Typs P4-D-hPhe-Pro-AMCB	167
5.4.2.6 Synthese der Inhibitoren mit substituierten Prolin-Derivaten in P2-Position	169

5.4.2.7 Synthese des Inhibitors Mes-d-Arg-Pro-AMCB	172
5.4.2.8 Synthese eines zyklischen Inhibitors	173
5.5 Synthese der Substrate	174
5.5.1 Synthese der Matriptase-Substrate	174
5.5.1.1 Mes-D-Arg-Ala-Arg-AMC	174
5.5.2 Synthese der KLK 7-Substrate	175
5.5.2.1 Substrate des Typs Mes-D-Arg-P2-P1-AMC	175
5.5.2.2 Substrate des Typs BzIs-D-Arg-Pro-P1-AMC	176
6 Literaturverzeichnis	177
7 Danksagung	193
8 Curriculum Vitae	194
9 Erklärung	195

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
α 1-AT	α 1-Antitrypsin
ABMCB	2-Amino(Boc)methyl-5-chlorbenzylamin
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AD	Atopische Dermatitis
Amba	4-Amidinobenzylamid
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AMCB	2-Aminomethyl-5-chlorbenzylamin
Äquiv.	Äquivalent
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazolyl-oxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat
BPTI	<i>bovine pancreatic trypsin inhibitor</i>
BSA	Rinderserumalbumin
Bzl	Benzyl
Bzls	Benzylsulfonyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CM	Carboxymethyl
CMK	Chlormethylketon
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin (Hünig-Base)
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
EtO	Ethoxy
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
Ets	Ethylsulfonyl
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FXa	Gerinnungsfaktor Xa
H-Gly(Phpr)-OH	Phenylpropylglycin Phenylalanin schreibst Du auch ohne Klammern
HAI-1	<i>hepatocyte growth factor activator inhibitor 1</i>
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
hPhe	Homophenylalanin
hTyr	Homotyrosin
i.V.	im Vakuum
kDa	Kilodalton
K_i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
KLK	Kallikrein
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LC	Flüssigchromatographie
LEKTI	<i>lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor</i>
LM	Lösungsmittel
Me	Methyl
MeO	Methoxy

MeOH	Methanol
Mes	Methylsulfonyl
MMP	Matrixmetalloprotease
MS	Massenspektrometrie
MTSP-1	<i>membrane-type-serine-protease 1</i>
n.b.	nicht bestimmt
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NS	Netherthon-Syndrom
Nva	Norvalin
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PDB	Proteindatenbank
Piv	Pivalinoyl
pNA	<i>para</i> -Nitroanilin
ppm	parts per million
Pyr	Pyridyl
R _f	Retentionsfaktor
rpm	Umdrehungen je Minute
RT	Raumtemperatur
SCCE	<i>stratum corneum chymotryptic enzyme</i>
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
ST14	<i>suppressor of tumorigenicity 14</i>
Succ	Succinyl
TADG-15	Tumor-assoziiertes differentiell exprimiertes Gen-15
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TLC	Dünnschichtchromatographie
TIS	Triisopropylsilan
Tle	<i>tert</i> -Leucin
TMS	Trimethylsilan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTSP	Type II Transmembran-Serinproteasen
V _{max}	Maximale Geschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion

1 Einleitung

1.1 Matriptase

Matriptase ist neben Matriptase-2, Matriptase-3 und Polyserase^[1] ein Mitglied der Matriptase-Subfamilie innerhalb der TTSPs. Neben einem kurzen cytoplasmatischen N-Terminus und einem Transmembransegment besitzt sie eine Stem-Region, die aus einer SEA-Domäne, zwei CUB-Domänen und vier LDLRA-Domänen besteht. Am C-Terminus befindet sich die trypsinartige Serinproteasedomäne (Abbildung 1).

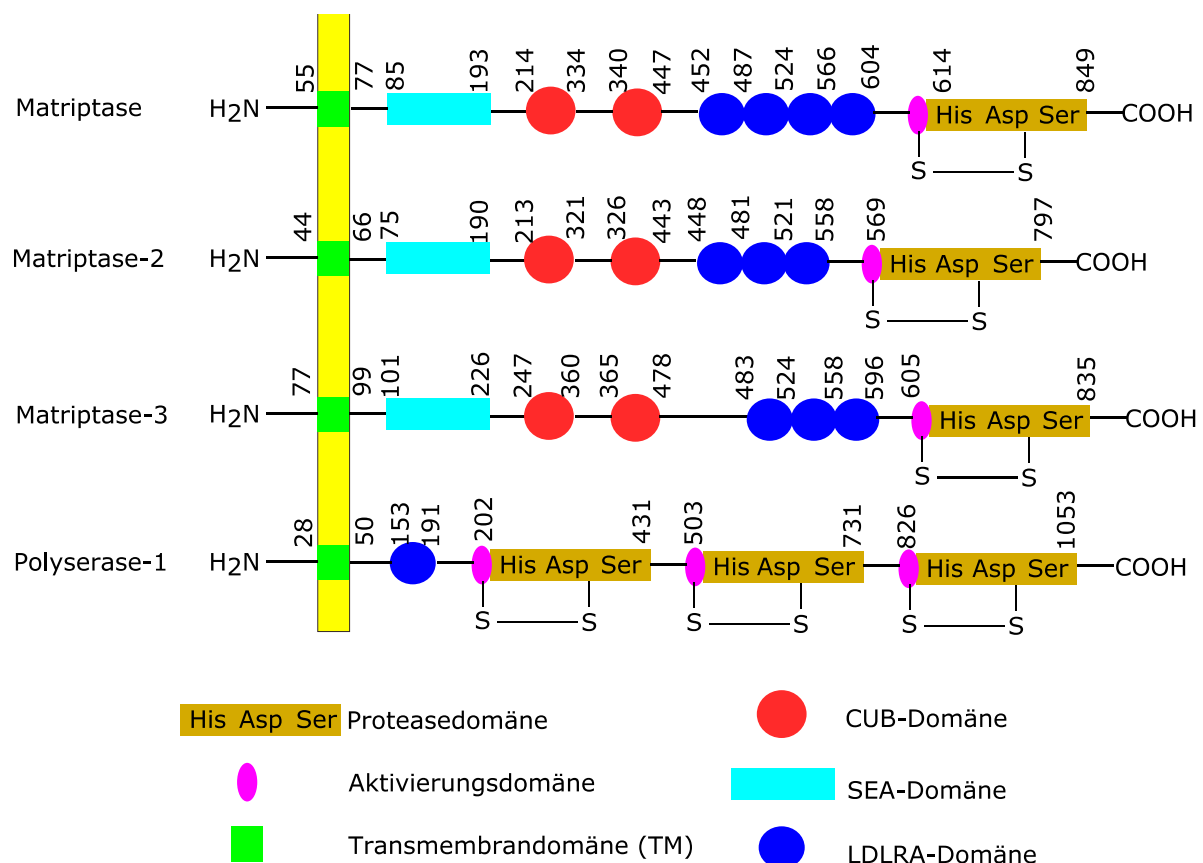


Abbildung 1: Domänenstruktur der Proteasen der Matriptase-Subfamilie. TM: Transmembrandomäne; CUB: Cls/Clr, urchin embryonic growth factor and bone morphogenetic protein-1; LDLRA: LDL receptor class A domain; SEA: sea urchin sperm protein enteropeptidase, agrin domain^[2].

Matriptase war das erste beschriebene Mitglied dieser Subfamilie^[3] und ist auch als *membrane-type-serine-protease 1* (MT-SP1)^[4], *tumor-associated differentially expressed gene 15* (TADG 15)^[5], *suppressor of tumorigenicity 14* (ST-14) und, im Falle des analogen Maus-Proteins, als Epithin bekannt.

Die Protease wird in einer Vielzahl epithelialer Gewebe^[6], ebenso wie in Zellen des Immunsystems, welches u.a. Mastzellen, Monozyten und Makrophagen umfasst, exprimiert.

1.1.1 Struktur und Aktivierung

Nach ihrer Synthese als inaktives Zymogen erfolgt die Aktivierung (Abbildung 2) in einem mehrstufigen Prozess^[7-9], welcher zwei aufeinanderfolgende proteolytische Spaltungen erfordert. Die erste Spaltung erfolgt im endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi-Apparat hinter Gly149 innerhalb der SEA-Domäne. Anschließend kommt es zur Anlagerung des endogenen Inhibitors HAI-1 (*hepatocyte growth factor activator inhibitor 1*)^[10] und zum Transport des Komplexes zur Zelloberfläche, wo der zweite Aktivierungsschritt stattfindet. Hierbei kommt es zu einer autoproteolytischen Spaltung innerhalb der Protease-Domäne zwischen den Resten Arg614 und Val615 (Arg15 und Val16 entsprechend der Chymotrypsinogennummerierung) innerhalb des Motivs RQAR↓VVGG^[7, 11].

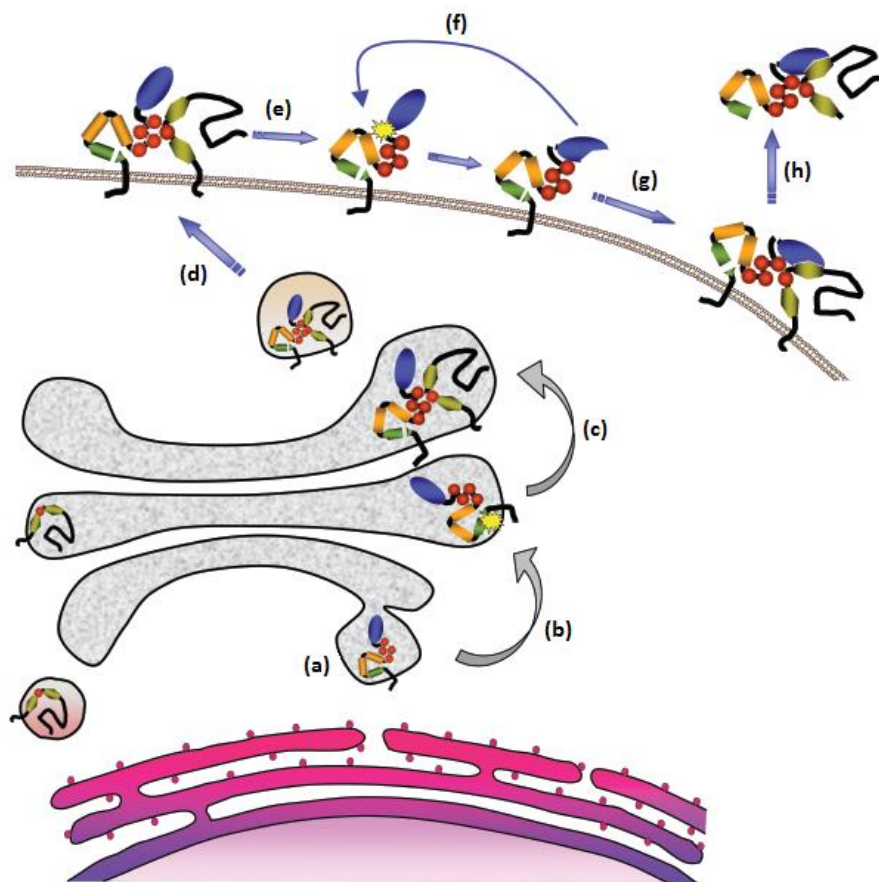


Abbildung 2: Reifungsprozess der Matriptase. Nach der Synthese (a) am endoplasmatischen Retikulum kommt es zur proteolytischen Spaltung hinter Gly149 innerhalb der SEA-Domäne der Matriptase (b) und zur Zusammenlagerung mit HAI-1 (c). Der gebildete Komplex wird zur Zelloberfläche transportiert (d), wo es, nach Freisetzung der Matriptase aus dem Komplex (e) zur finalen Aktivierung des Enzyms durch autoproteolytische Spaltung hinter Arg614 (Arg15) kommt (f). Aktivierte Matriptase kann wiederum durch HAI-1 gehemmt (g) und als inaktiver Komplex von der Zelloberfläche gesheddet werden (h) (Grafik modifiziert nach^[7]).

Die Struktur des katalytischen Zentrums ist ähnlich wie bei anderen trypsinartigen Serinproteasen aufgebaut. Aufgrund hoher Homologie kann die Primärstruktur der Matriptase mit der Sequenz des Chymotrypsins überlagert werden. Zur besseren Vergleichbarkeit werden nachfolgend die Positionen der Matriptasereste entsprechend der Chymotrypsinogensequenz nummeriert.

In der Literatur sind zahlreiche Kristallstrukturen der Matriptase beschrieben, unter anderem in Komplex mit Benzamidin^[12], BPTI (*bovine pancreatic trypsin inhibitor*), synthetischen Inhibitoren des 3-Amidinophenylalanin-Typs^[13] und SFTI (*sunflower trypsin inhibitor*)^[14] und anderen niedermolekularen Hemmstoffen^[15].

Während viele trypsinartige Serinproteasen, wie die Gerinnungsproteasen Thrombin und Faktor Xa aber auch KLK7, in Position 190 einen Alanin-Rest besitzen, ist dieser bei Matriptase durch Ser190 ersetzt, wodurch die S1-Tasche etwas hydrophiler und enger wird^[16]. Durch den Rest Asp189 am Boden der S1-Tasche bindet Matriptase bevorzugt basische Reste wie Arg oder Lys^[17-18], aber auch Arginin-Mimetika^[14], die in synthetischen Hemmstoffen der Matriptase Verwendung finden. Die Reste 189-195 und 214-220, welche die Wandung der S1-Tasche bilden, entsprechen im Wesentlichen anderen Serinproteasen.

Die S2-Tasche der Matriptase ist besonders für die Aufnahme kleiner bis mittelgroßer Reste wie Alanin oder Serin geeignet^[17]. Da der Rest Phe99, welcher in seiner normalen Lage den Zugang voluminöser Reste zur S2-Tasche erschwert, eine gewisse Flexibilität in seiner Seitenkette besitzt, ist auch die Bindung größerer Reste wie Phe^[17] möglich.

Die S3/4-Tasche der Matriptase ist in Abbildung 3 dargestellt und wird von den drei aromatischen Resten Phe99, Phe97, Trp215, sowie Gln175, auf der linken Seite ausgebildet. In diese Tasche binden bevorzugt aromatische Reste, aber auch kationische Gruppen.

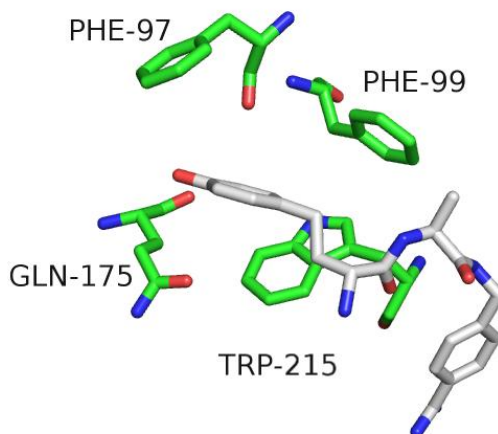


Abbildung 3: Modellierter Komplex des Inhibitors H-D-hTyr-Ala-4-amidinobenzylamid (**50**) (Kohlenstoffatome grau, Stickstoff blau, Sauerstoff rot) im aktiven Zentrum der Matriptase (Kohlenstoffe der Matriptasereste in grün dargestellt). Die S3/S4-Tasche wird oben von Phe97, am Boden von Trp215, links von Gln175 und rechts von Phe99 begrenzt. Die Seitenkette des D-hTyr-Restes in P3-Position des Inhibitors **50** ist in diese Bindetasche gerichtet.

Nach dem Rest 60 besitzt Matriptase einen charakteristischen Insertionsloop (60er-Loop), der aus 9 Aminosäuren mit der Sequenz DDRGFRYSD besteht und oberhalb des aktiven Zentrums platziert ist. Die mit der Matriptase verwandte Serinprotease Thrombin besitzt

ebenfalls einen 60er-Loop (Abbildung 4), der jedoch voluminöser ist (Sequenz YYPWDKNFT) und in das aktive Zentrum ragt.

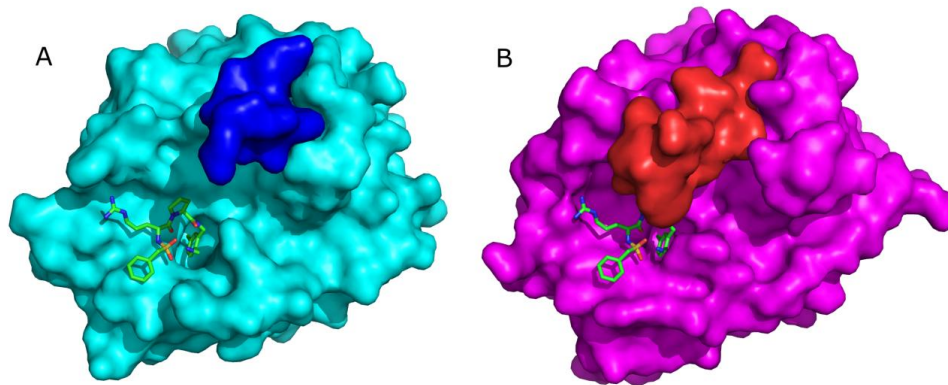


Abbildung 4: Vergleich der 60er-Loops von Matriptase und Thrombin. (A) Struktur der Matriptase (PDB: 2GV6), die Oberfläche des Enzyms ist hellblau dargestellt, der 60er-Loop dunkelblau. (B) Struktur des Thrombins, (PDB: 3EQ0), die Oberfläche des Enzyms ist pink dargestellt, der 60er-Loop rot. Zur besseren Erkennbarkeit ist jeweils BzIs-D-Arg-Pro-AMCB (**1**) (Kohlenstoffe grün, Stickstoff blau, Sauerstoff rot, Schwefel braun) im aktiven Zentrum der Enzyme gezeigt. Die Grafik wurde mittels OpenSourcePyMOL 1.7.2.1 erzeugt.

1.1.2 Substrate und ihre Bedeutung für die Cancerogenese

Matriptase ist u.a. in der Lage, die Proformen des HGF^[19] und des uPA (*urokinase-type plasminogen activator*)^[17] sowie den G-Protein-gekoppelten proteaseaktivierten Rezeptor 2 (PAR-2)^[17, 20] zu aktivieren.

In einem kaskadenartigen Prozess (Abbildung 5) spaltet Matriptase pro-uPA, welches über einen spezifischen uPA-Rezeptor auf der Zelloberfläche gebunden ist, dadurch kommt es zur Aktivierung des Plasminogen-Systems außerhalb der Zirkulation. Plasmin ist in der Lage, eine Reihe von MMPs zu aktivieren, was zum Abbau der extrazellulären Matrix führt und die Migration von Tumorzellen ermöglicht. Die Aktivierung von MMP3 (Stromelysin) erfolgt im Gegensatz hierzu direkt durch Matriptase^[21]. Der Verlust der Adhäsionsfähigkeit durch Aktivierung des pro-HGF erhöht die Motilität der Zellen und begünstigt somit eine Metastasierung. Die Komponenten des Plasminogen-Aktivierungssystems sind in zahlreichen Tumoren hochreguliert^[22-23] und fördern somit die Metastasierung bei Krebserkrankungen durch Spaltung extrazellulärer Substrate.

Der *pro-hepatocyte growth factor / scattering factor* (HGF/SF), welcher durch Matriptase aktiviert wird^[19], bindet an die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met und aktiviert diese. Aktiviertes c-Met wiederum initiiert mehrere Signalwege, welche zur Förderung von Tumorwachstum und Metastasierung führen^[24-26]. Eine Hemmung der Bindung von HGF an den Rezeptor führt zu einem verminderten Tumorwachstum und reduzierter Metastasierung^[27-29].

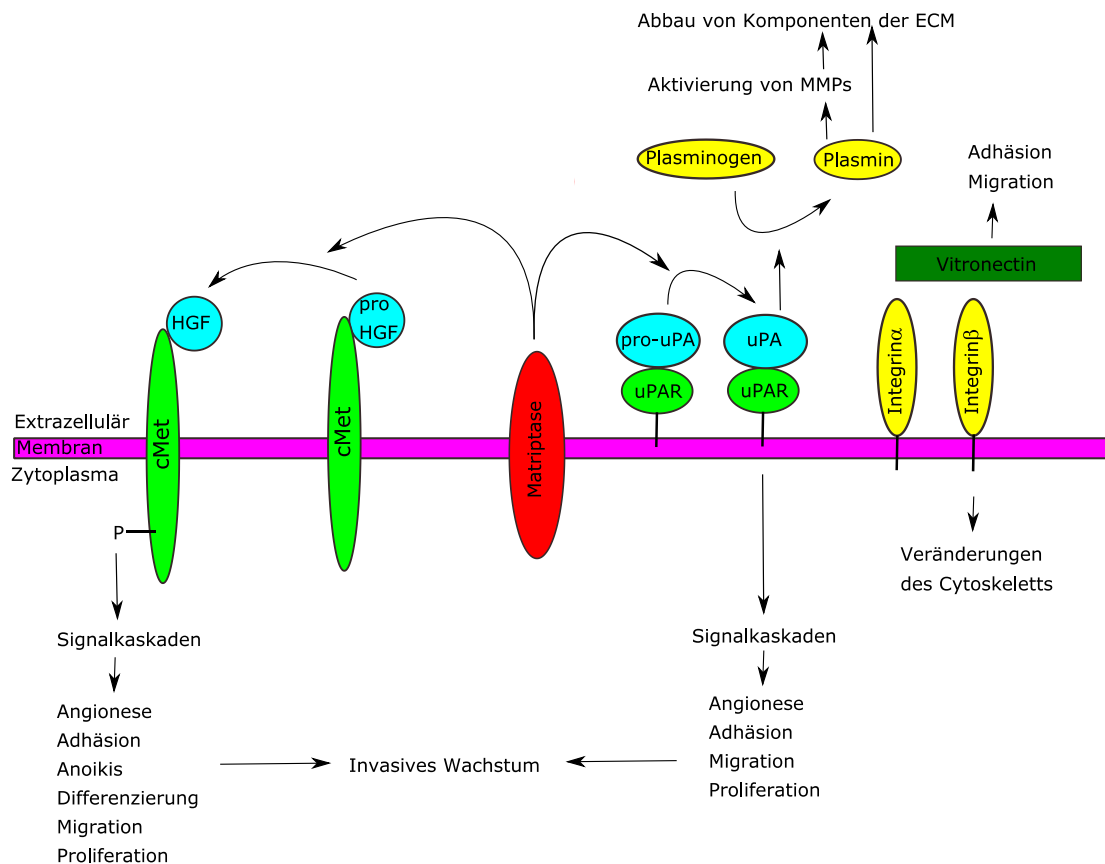


Abbildung 5: Funktion der Matriptase bei Krebs. Matriptase spaltet pro-HGF, anschließend aktiviert das gebildete HGF C-Met. Das führt zur Aktivierung von Signalkaskaden, die das Wachstum, die Proliferation und das Streuen von Tumoren fördern. Matriptase aktiviert auch pro-uPA, wobei uPA in der Lage ist, Plasmin zu aktivieren. Plasmin kann seinerseits direkt oder durch Aktivierung von Matrixmetalloproteasen Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen. Grafik erstellt nach^[24].

Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor PAR-2 ist ein weiteres Substrat der Matriptase, das an der Zelloberfläche lokalisiert ist^[20]. Der Rezeptor, welcher prinzipiell neben Matriptase auch von Trypsin, Tryptase oder FXa^[30] aktiviert werden kann, beeinflusst Zellproliferation, Zellbeweglichkeit und Entzündungsreaktionen und ist daher auch an der Metastasierung beteiligt^[31].

Eine weiteres Matriptasesubstrat ist die Serinprotease Protsin (CAP1/PRSS8), die ebenfalls an der Zelloberfläche lokalisiert ist^[32]. Diese Aktivierung erfolgt auch *in vivo*, obwohl die Aktivierungssequenz des Protsin (Ile-Gln-Pro-Arg↓Ile) keine ideale Substratsequenz der Matriptase ist, da diese Substrate mit einer zweiten basischen Aminosäure in P3 oder P4 Position bevorzugt^[33].

Durch Untersuchungen am Mausmodell^[34] existieren Befunde, dass auch die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Serinprotease Kallikrein 7, die für Zell-Zell-Adhäsion wichtig ist, ein mögliches Substrat der Matriptase ist.

Die gezeigten Beispiele zeigen, dass Matriptase eine Reihe von Substraten aktivieren kann, die für Adhäsion, Migration und Proliferation von Zellen bedeutsam sind. Eine Störung dieser Funktionen kann zur Entstehung von Krebserkrankungen führen.

1.1.3 Krebserkrankungen epithelialer Gewebe

Matriptase wird in einer Vielzahl von Tumoren epithelialer Gewebe verstärkt exprimiert und wurde zuerst in Brust-Karzinomen gefunden^[7, 35]. Mittlerweile wurden jedoch in einer Vielzahl gutartiger und bösartiger Tumore epithelialer Gewebe, wie Prostatakarzinomen^[36], Eierstockkrebs^[37], Gebärmutterhalskrebs^[38], oralem Plattenepithelkarzinom^[39] und Tumoren der Niere, erhöhte Matriptaseaktivitäten gefunden.

In vielen Karzinomen ist das Wachstum des Tumors mit einem deutlichen Anstieg der mRNA der Matriptase und einer erhöhten Expression verknüpft. Beispielweise ist der Level der Matriptase in Krebszellen der Eierstöcke um den Faktor 5 erhöht. Diese erhöhte Expression korreliert mit der Aggressivität der Tumore, wobei die Expression der Matriptase in Tumoren eines fortgeschrittenen Stadiums geringer war^[37, 40]. In einigen Tumoren des Gastrointestinaltraktes ist jedoch im Gegensatz dazu die Expression der Matriptase und ihres Inhibitors HAI-1 im Vergleich zu gesundem Gewebe verringert^[41].

Die Expression der Matriptase ist in frühen Tumoren (Phase I/II) in der Regel höher als in Tumoren der Phasen III/IV. In späteren Stadien der Tumore ist das Verhältnis Matriptase/HAI-1 erhöht, was darauf hindeutet, dass eine verringerte Hemmung der Matriptase für die späteren Erkrankungsstadien von Bedeutung ist^[42]. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein gestörtes Verhältnis zwischen Expression der Matriptase und dem endogenen Inhibitor HAI-1, das zu erhöhter enzymatischer Aktivität führt, zum Fortschreiten der Tumorerkrankungen beiträgt. Zwischen der Expression von Matriptase, HAI-1, pro-HGF und der cytoplasmatischen Form des HGF-Rezeptors/c-Met wurde eine Korrelation festgestellt, was auf die Bedeutung der Co-Expression der Matriptase mit Wachstumsfaktoren hindeutet^[43].

Eine weitere Studie zeigte, dass die Aktivität der Matriptase auch durch ihr Glykosylierungsmuster reguliert wird. Matriptase ist ein Substrat der N-Acetylglucosyltransferase V (GnT-V), eines Enzyms, welches die Verzweigung von N-Glykanen an der Zelloberfläche katalysiert. Eine erhöhte Expression von GnT-V in Magenkrebsgeschwüren führt zu veränderten Glykosylierungsmustern, wodurch erhöhte Matriptaseaktivitäten resultieren, da durch die Glykosylierung ein besserer Schutz des Enzyms gegenüber proteolytischem Abbau resultiert^[44].

1.1.4 Arthrose

In Studien von Milner et al.^[45] wurde gezeigt, dass mehrere Serinproteasen und MMPs eine wichtige Rolle beim Knorpelabbau (Abbildung 6) spielen. Die Proteasen sind für den Abbau des Typ-2-Kollagens, des Hauptbestandteils des Knorpels, verantwortlich und daher potentielle Zielstrukturen zur Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Therapie der Arthrose.

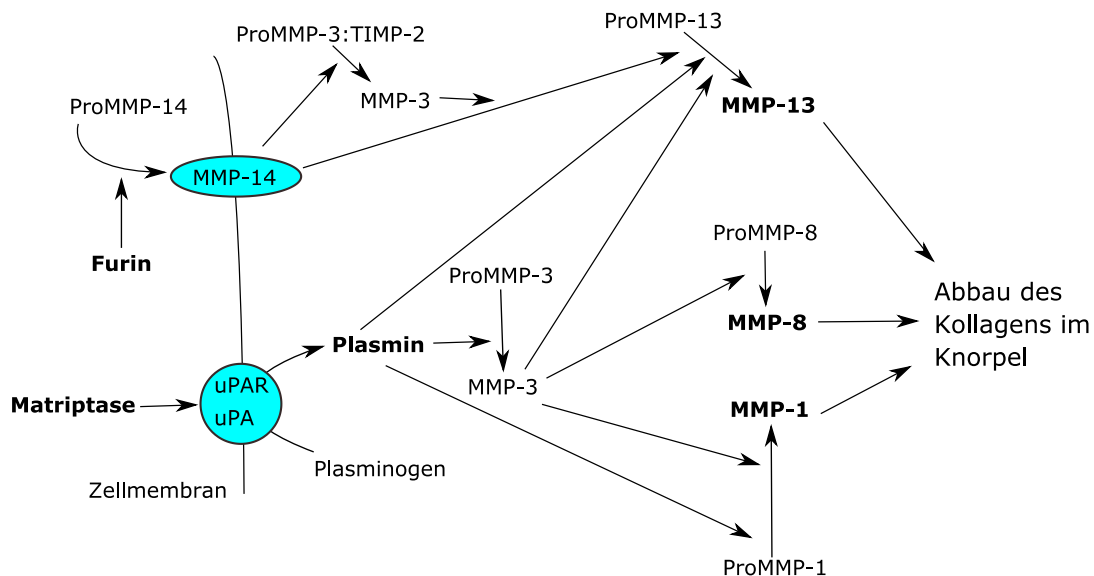


Abbildung 6: Abbau des Knorpels durch MMPs. Nach Aktivierung des Plasmins durch uPA, welches wiederum durch Matriptase aktivierbar ist^[17], kommt es zur Aktivierung mehrerer MMPs, die in der Lage sind, den Knorpel abzubauen. Grafik erstellt nach^[45].

Matriptase ist im Falle der Arthrose überexprimiert und tritt als Initiator von Prozessen auf, die zu einer verstärkten Kollagenolyse führen. Die Aktivierung von PAR-2 durch Matriptase^[20, 46] führt zu einer verstärkten Bildung der Matrixmetalloproteasen MMP-1, MMP-3 und MMP-13, welche Kollagen abbauen (Abbildung 6). Durch eine Hemmung des PAR-2 kann die durch Matriptase initiierte Kollagenolyse verhindert werden^[47-49], was darauf hindeutet, dass die Aktivierung der MMPs nicht direkt durch Matriptase erfolgt.

Da Matriptase über die Aktivierung von PAR-2 einen Initiator der Kollagenolyse und damit des Knorpelabbaus darstellt, könnte sie als neue Zielstruktur zur Therapie der Arthrose dienen.

1.1.5 Natürliche Hemmstoffe und Derivate

Hemmstoffe des Kunitz-Typs besitzen Inhibitor-domänen, die aus 50 bis 60 Aminosäuren bestehen. Diese Domäne bindet an das aktive Zentrum von Serinproteasen, dabei kommt es zur Ausbildung stabiler, aber nicht-kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplexe^[50]. Zu dieser Hemmstofffamilie gehört auch der endogene Inhibitor HAI-1, der mehrere membrangebundene Serinproteasen wie Matriptase, Protsin, HAT, TMPRSS13 und Hepsin hemmt. Der Inhibitor ist ein Transmembranprotein des Typs I mit einem in das Cytoplasma ragenden C-Terminus und zwei extrazellulären Kunitz-Domänen, die durch eine LDL-Rezeptor-Domäne getrennt sind. Der mit HAI-1 verwandte Inhibitor HAI-2 ist ebenfalls in der Lage, Matriptase zu hemmen^[51].

Ecotin, ein aus E.Coli isolierter Inhibitor^[52], hemmt Matriptase mit einem K_i -Wert von 0,78 nM. Die mutierte Form (M84R, M85R) ist mit einer Hemmkonstante von 9,8 pM noch deutlich wirksamer. Ecotin ist ein Homodimer, das aus je 2 Untereinheiten von 16 kDa besteht und in der Lage ist, eine große Anzahl von Serinproteasen, wie beispielsweise Trypsin, Chymotrypsin oder Elastase zu hemmen^[52]. Durch Kristallisation von Ecotin im Komplex mit Trypsin konnte gezeigt werden, dass es zur Ausbildung eines heterotetrameren Komplexes zwischen zwei Inhibitormolekülen und zwei Proteasen kommt, wobei jedes Proteasemolekül Kontakt zu beiden Ecotin-Molekülen hat^[53].

SFTI-1 (*sunflower trypsin inhibitor-1*) (**2**) ist ein weiterer natürlicher Hemmstoff der Matriptase ($K_i = 0,92$ nM), der ursprünglich in Sonnenblumensamen entdeckt wurde^[54]. Das bitykliche, aus 14 Aminosäuren bestehende Peptid enthält eine Disulfidbrücke zwischen den Resten Cys3 und Cys11. Es wurde eine Reihe von Derivaten des SFTI-1 synthetisiert (Abbildung 7)^[55-56], wobei versucht wurde, die Oxidationsstabilität des Moleküls durch Modifikation der Disulfidbrücke zu erhöhen. Diese Änderungen führten jedoch zu einer leichten (**3**) bzw. deutlichen (**4**) Reduktion der Matriptasehemmwirkung.

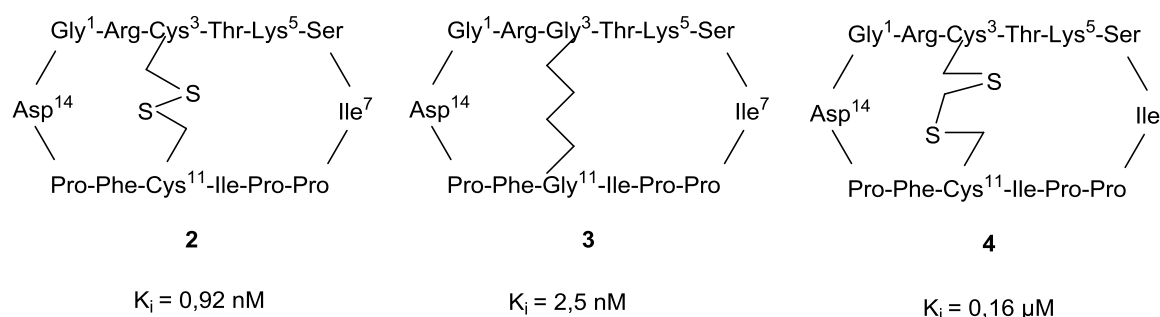


Abbildung 7: Hemmung der Matriptase durch SFTI-1 (**2**) und die synthetischen Analoga **3** und **4**^[55, 57].

In der Literatur^[14] (PDB: 3P8F) wurde eine Kristallstruktur des SFTI **2** im Komplex mit Matriptase veröffentlicht (Abbildung 8). Die Struktur zeigt, dass Lys5 des Inhibitors in die S1-Tasche der Matriptase gerichtet ist und Wasserstoffbrücken zum Carbonyl-Sauerstoff und zur Hydroxyl-Gruppe von Ser190 ausbildet. Jedoch kommt es nicht zur vermuteten Salzbrücke zwischen der terminalen Aminogruppe des Lysins mit der Seitenketten-Carboxylgruppe des Asp189. Die Guanidino-Gruppe der Arg2-Seitenkette zeigt in Richtung der S3/4-Tasche, wodurch es zur Ausbildung von Kation- π -Wechselwirkungen mit den aromatischen Ringen der Reste Phe97, Phe99 und Trp215 kommt^[14].

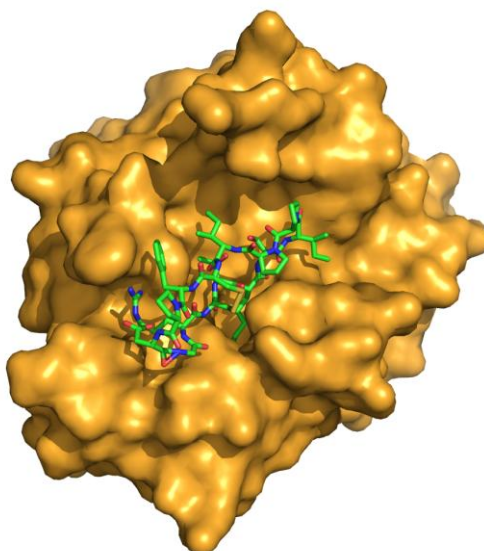


Abbildung 8: Komplex des SFTI-1 (**2**) (Kohlenstoffe grün, Stickstoffe blau, Sauerstoffe rot, Schwefel gelb) im aktiven Zentrum der Matriptase (3PFf8, Oberfläche hellorange)^[14]. Grafik erstellt mittels OpenSourcePyMOL (Version 1.7.2.1).

Da Matriptase an der Zelloberfläche lokalisiert und somit für größere Moleküle erreichbar ist, wurden auch monoklonale Antikörper entwickelt. Antikörper sind in der Regel deutlich selektiver und weniger toxisch als andere Inhibitoren. Die hochwirksamen ScFv-Proteine (*single chain variable region fragment*) werden aus den variablen Regionen der leichten und schweren Kette von Antikörpern gebildet, die über einen Peptid-Linker verknüpft sind^[58]. Einige scFv-Proteine mit einem Molekulargewicht von zirka 30 kDa blockieren den Zugang zum aktiven Zentrum der Matriptase und hemmen das Enzym mit K_i -Werten im Bereich von 50 pM bis 130 nM. Aufgrund ihres hohen Molekulargewichts sind diese Verbindungen jedoch nicht oral applizierbar.

1.1.6 Niedermolekulare synthetische Matriptaseinhibitoren

Die zuvor beschriebenen Hemmstoffe besitzen relativ hohe Molekulargewichte, deshalb sind sie nicht oral applizierbar. Normalerweise kann eine orale Bioverfügbarkeit nur mit niedermolekularen Wirkstoffen erreicht werden.

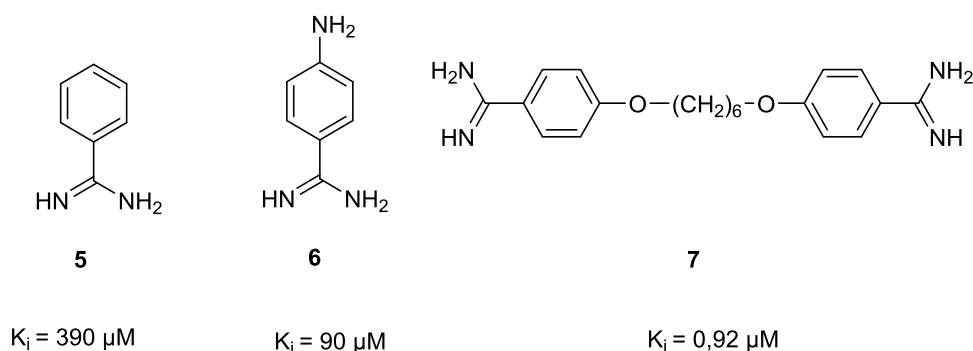


Abbildung 9: Matriptasehemmung durch einfache Benzamidinverbindungen^[59].

Benzamidinderivate (Abbildung 9) werden häufig als Mimetika des Arginins benutzt und sind daher als P1-Rest in vielen Inhibitoren tryptinartiger Serinproteasen zu finden^[18]. Benzamidin und einfache Derivate hemmen Matriptase im mikromolaren Bereich, das Bis-Benzamidin **7** ist etwas stärker wirksam und inhibiert Matriptase mit einer Hemmkonstante von 0,92 μM ^[59]. Jedoch sind diese Verbindungen unselektiv und inhibieren zahlreiche tryptinartige Enzyme mit vergleichbarer Stärke.

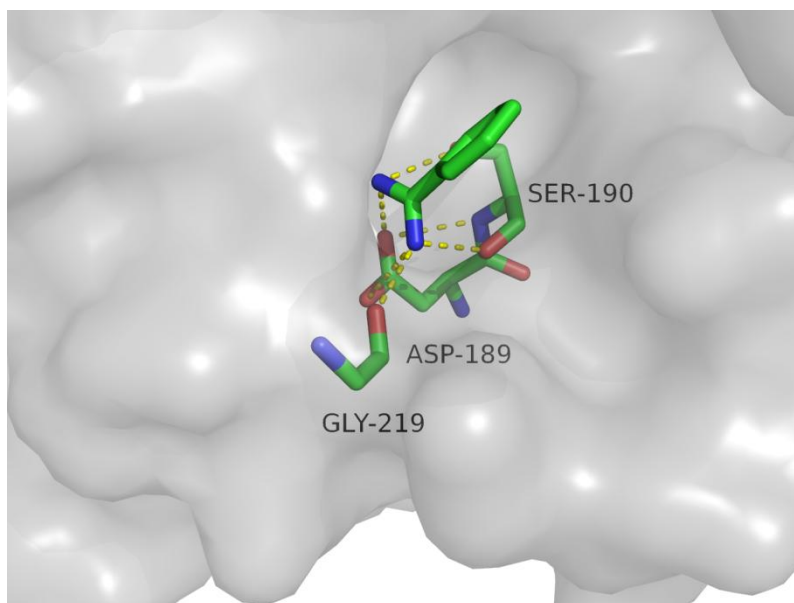


Abbildung 10: Bindungsmodus des Benzamidins (**5**) (Kohlenstoffe grün, Stickstoffe blau) in der S1-Tasche der Matriptase (mit transparenter Oberfläche in grau, PDB: 3PF8)^[14]. Das Benzamidin wechselwirkt mit den Resten Asp189, Ser190 und Gly219 (Kohlenstoffe grün, Stickstoffe blau, Sauerstoffe rot). Grafik erstellt mittels OpenSourcePyMOL (Version 1.7.2.1).

Während es durch die Benzamidinderivate zu einer reversiblen Hemmung kommt, sind Phosphonatderivate irreversible Inhibitoren vieler Serinproteasen und eignen sich daher besonders zur Markierung von Proteasen^[60-61]. Biotinylierte Matriptaseinhibitoren mit einem basischen P1-Diphenyl-Peptidphosphonat wurden von Brown et al.^[62] beschrieben. Modellierungstudien^[63] lassen vermuten, dass das Phosphoratom des mit einem Fluorophor markierten Inhibitors **8** kovalent an Ser195 im aktiven Zentrum der Matriptase bindet und eine doppelte Salzbrücke zwischen der Benzamidingruppe des Inhibitors und der Seitenkette des Asp189 ausgebildet wird (Abbildung 10).

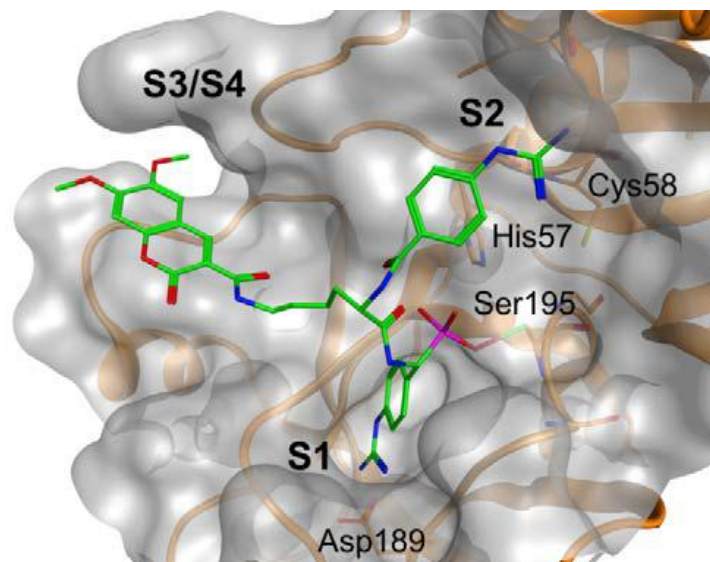


Abbildung 11: Modellierter Komplex des kovalent gebundenen fluorogenen Inhibitors **8** in Matriptase. Grafik entnommen aus^[63].

Eine weitere Klasse von Inhibitoren sind substratanaloge Strukturen, die in der Regel ein Argininmimetikum als C-terminalen Rest besitzen (Abbildung 12).

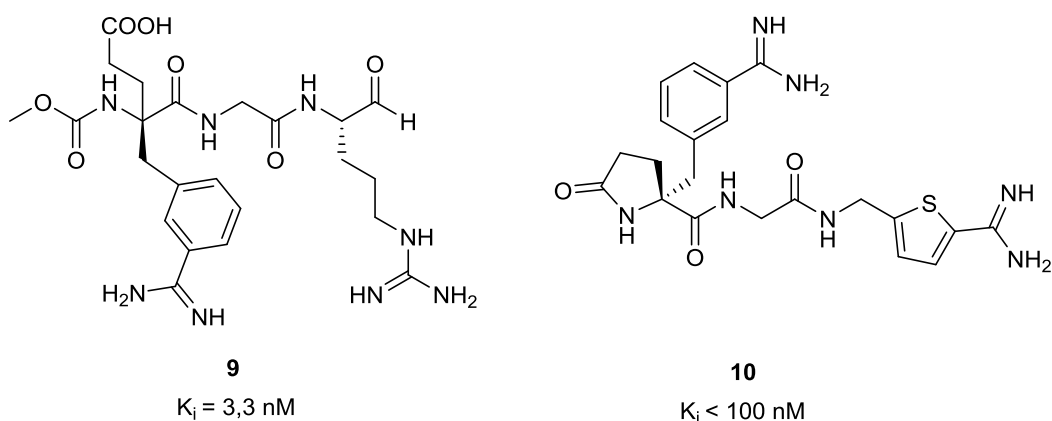


Abbildung 12: Substratanaloge Hemmstoffe der Matriptase^[64-65].

In einer Serie substratanaloger Hemmstoffe mit einem Arginal-Rest am C-Terminus zeigte Verbindung **9** (CVS-3983)^[64] eine starke Hemmwirkung gegenüber Matriptase (Abbildung 12), während die verwandten Serinproteasen FXa, Plasmin, tPA und uPA nur mit Hemmkonstanten $> 1 \mu\text{M}$ inhibiert wurden. Da keine Kristallstruktur der Verbindung **9** in Matriptase verfügbar ist, kann keine eindeutige Aussage zum Bindungsmodus getroffen werden. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Aldehydfunktion des Arginalrestes ein Halbacetal mit der Hydroxylfunktion des Ser195 ausbildet und die Guanidinofunktion der P1-Seitenkette in üblicher Form mit Asp189 interagiert. Das Benzamidin am dialkylierten P3-Rest bindet vermutlich in die S3/4-Tasche und trägt zur Spezifität und Affinität des Inhibitors bei. Aldehydderivate sind jedoch wegen ihrer reaktiven P1-Gruppe nur von geringem therapeutischem Interesse.

In der Literatur sind auch sehr viele Inhibitoren gegen Thrombin^[66-67], FXa^[68] und FVIIa^[69] beschrieben, die als decarboxyliertes Argininmimetikum einen 4-Amba-Rest in Position P1 besitzen. Von der Firma Corvas^[65] wurde eine Serie mit decarboxylierten P1-Resten in einem Patent beschrieben, die Verbindung **10** soll Matriptase mit einem K_i -Wert < 100 nM inhibieren, ein exakter Wert wurde nicht angegeben. Die Verbindungen **11** und **12** mit einem C-terminalen 4-Amba-Rest wurden ursprünglich als substratanaloge Inhibitoren des Gerinnungsfaktors Xa entwickelt^[68], besitzen jedoch auch eine signifikante Matriptaseaffinität, während Thrombin, uPA und Plasmin relativ schwach gehemmt werden (Abbildung 13).

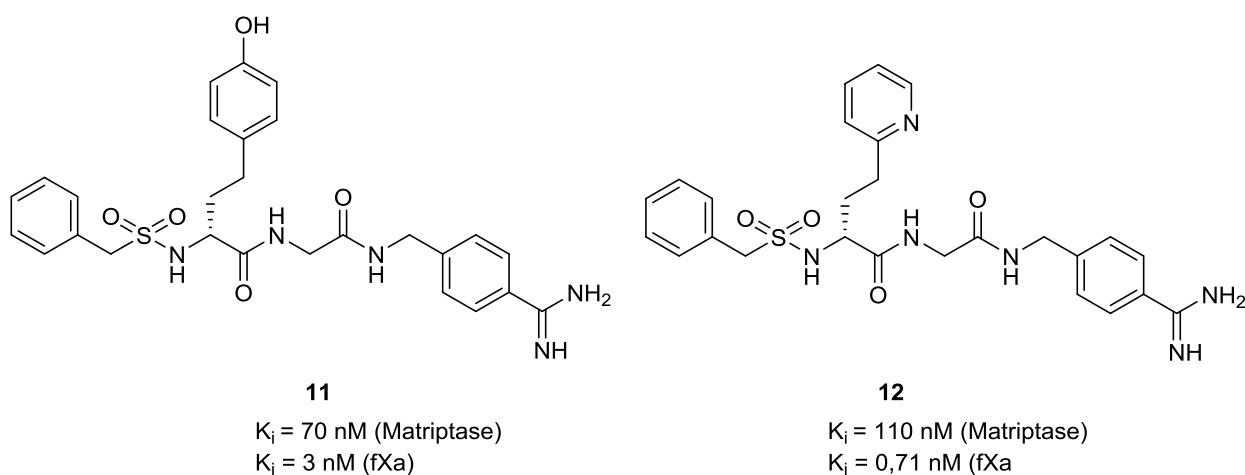


Abbildung 13: Substratanaloge Hemmstoffe der Matriptase mit D-hPhe-Analoga in P3^[68]

Eine weitere Gruppe synthetischer Matriptasehemmstoffen sind Derivate des 3-Amidinophenylalanins^[13]. Verbindung **13** (Abbildung 14), die ursprünglich als Inhibitor gegen uPA entwickelt wurde^[70], hemmt Matriptase mit einem K_i -Wert von 0,37 μM und verwandte Serinproteasen, wie Plasmin und Thrombin, mit vergleichbarer Stärke. In präklinischen Studien^[71] zeigte sich, dass Inhibitor **13** die Metastasierung und das Wachstum von Brustkrebs signifikant reduzieren kann. Durch Ersatz der stark basischen Amidinofunktion ($\text{pK}_a \approx 11,5$) durch eine Hydroxyamidinogruppe ($\text{pK}_a \approx 5,2$)^[67] wurde das oral wirksame Prodrug **14** erhalten. Durch die Firma Wilex AG wurde für Verbindung **14** (Mesupron) die klinische Erprobungsphase II Ende 2012 abgeschlossen.

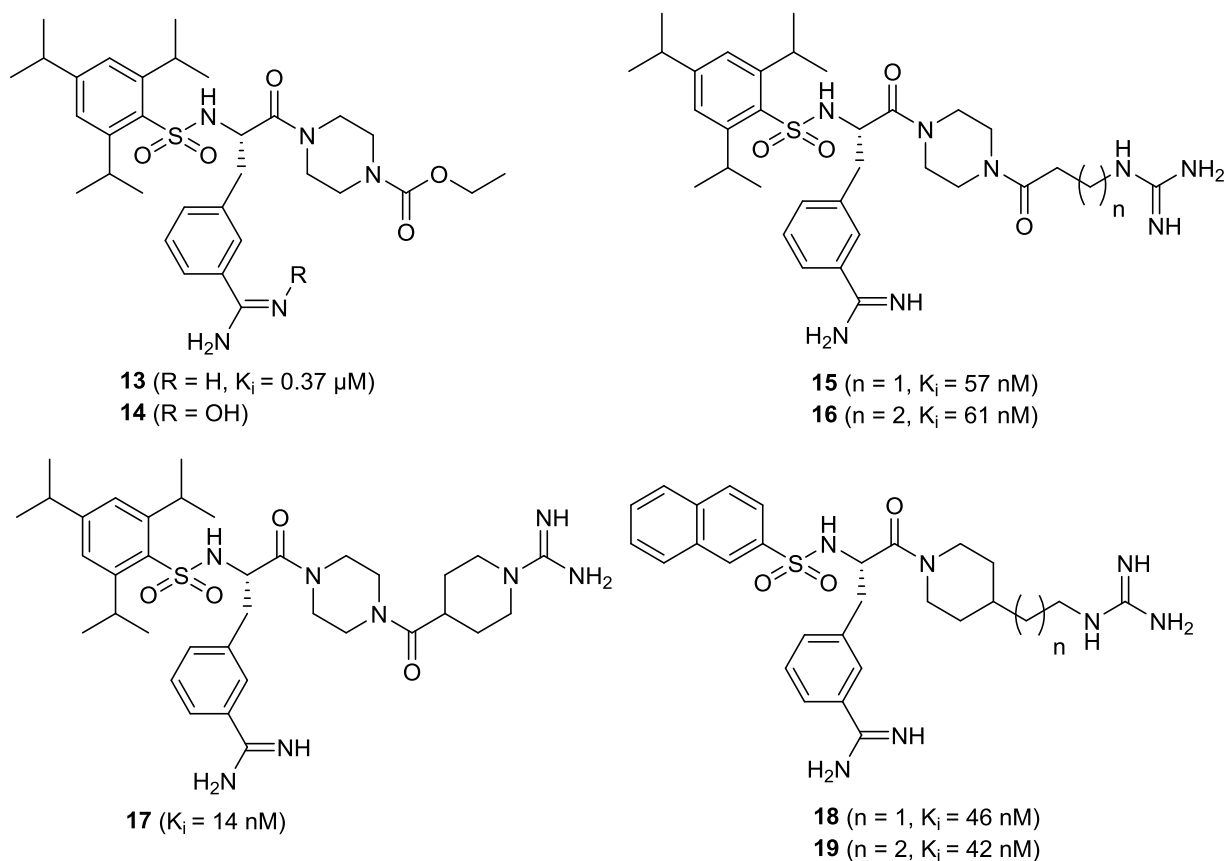


Abbildung 14: 3-Amidinophenylalanin-basierte Hemmstoffe.

Der Einbau einer C-terminalen Guanidinogruppe in diesen Inhibitorotyp führte zu einer stärkeren Matriptasehemmung. Wahrscheinlich kommt es zur Ausbildung zusätzlicher polarer Kontakte mit der sogenannten *cation cleft* der Matriptase, die durch die Carbonylgruppen der Reste His57, Ile60 und Asp96 ausgebildet wird. Beispielsweise hemmt Verbindung **15** Matriptase etwa um den Faktor 6 stärker als ihr Analogon **13** ohne basische Gruppe am C-Terminus^[13]. Die Verlängerung der C-terminalen Alkylkette (**15** vs. **16**) bewirkte keine wesentliche Veränderung der Hemmwirkung, wohingegen die Zyklisierung am C-Terminus von Verbindung **17** die Affinität gegenüber Matriptase um den Faktor 4 verstärkte. Verbindung **17** wurde im Komplex mit Matriptase kristallisiert (Abbildung 15 und 16) und die Struktur bestimmt, hierbei zeigte sich eine Bindung zwischen der Guanidinogruppe und dem Carbonyl-Sauerstoff von Ile60, dem ersten Rest des 60er-Loops (Abbildung 4) der Matriptase. Die anderen Interaktionen entsprechen den aus Komplexen von Thrombin, Trypsin oder uPA mit 3-Amidinophenylalanin-Derivaten bekannten Wechselwirkungen^[13]. Der Inhibitor nimmt eine Y-förmige Konformation ein, wobei das Benzamidin-Segment eine doppelte Salzbrücke mit der Carboxylgruppe des Asp189 am Boden der S1-Tasche ausbildet. Zwischen dem Rückgrat des 3-Amidinophenylalanins und Gly216 kommt es zur Ausbildung von zwei antiparallel ausgerichteten Wasserstoffbrückenbindungen, ein weiterer polarer Kontakt besteht zwischen einem Sulfonylsauerstoff und dem Amid-Stickstoff von Gly219 (Abbildung 16).

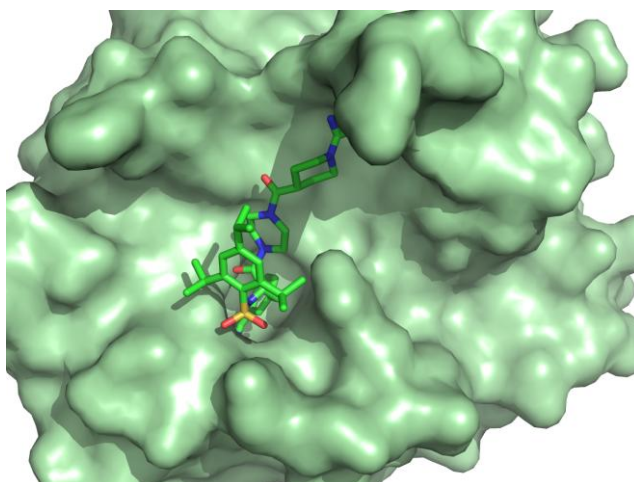


Abbildung 15: Komplex des Inhibitors **17** (Kohlenstoffe grün, Stickstoff blau, Sauerstoff rot, Schwefel braun) im aktiven Zentrum der Matriptase (mit hellgrüner Oberfläche, PDB: 2GV7,^[13]). Die Grafik wurde mittels OpenSourcePyMOL (Version 1.7.2.1) erstellt.

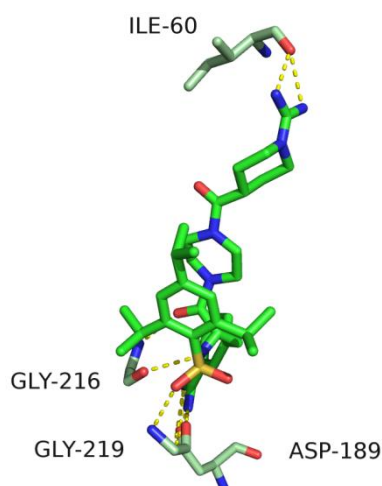


Abbildung 16: Polare Wechselwirkungen des Inhibitors **17** (Kohlenstoffe grün, Stickstoff blau, Sauerstoff rot, Schwefel gelb) mit den Matriptaseresten Ile60, Asp189, Gly216 und Gly219 (Kohlenstoffe hellgrün, Stickstoff blau und Sauerstoff rot, PDB: 2GV7)^[13]. Grafik erstellt mittels PyMOL.

Durch eine Eliminierung der C-terminalen Peptidbindung wurden die Verbindungen **18** und **19** (Abbildung 14) erhalten, die Matriptase mit nahezu identischen K_i -Werten von 46 bzw. 42 nM hemmen. Die Lage des Inhibitors **18** im aktiven Zentrum der Matriptase (Abbildung 17) ist ähnlich, wie bereits zuvor für den Komplex mit Verbindung **17** beschrieben. In beiden Komplexen ist die terminale Guanidinogruppe auf die sogenannte *cation cleft* ausgerichtet, welche von den Carbonylsauerstoffen von His57, Ile60 und Asp96 gebildet wird. In beiden Komplexen gibt es fast keine Wechselwirkungen zwischen den Arylsulfonylgruppen der Inhibitoren und der S3/4-Tasche der Matriptase.

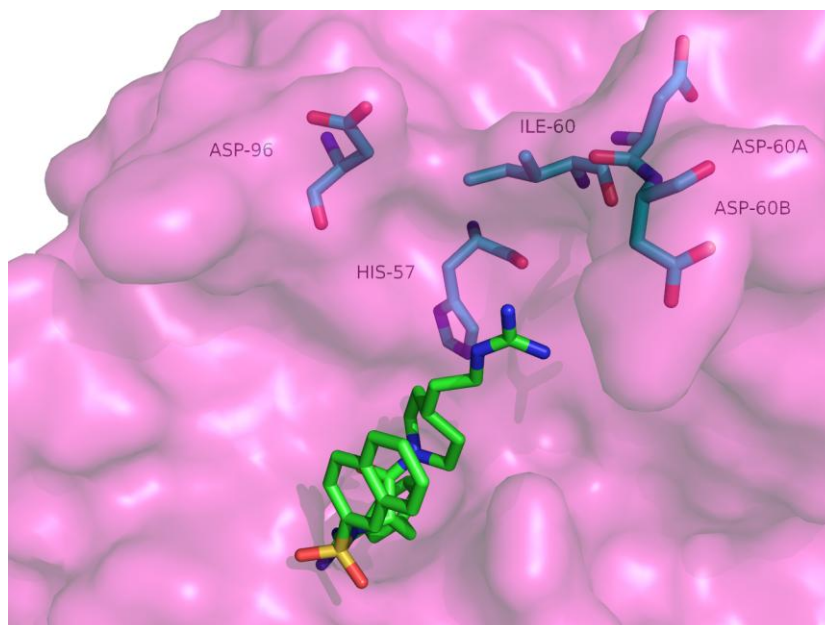


Abbildung 17: Komplex des Inhibitors **18** (Kohlenstoffe grün, Stickstoff blau, Sauerstoff rot, Schwefel gelb) in Matriptase (PDB: 2GV6, transparente Oberfläche pink)^[13]. Die Reste welche die Kationen-Spalte ausbilden, sind mit hellblauen Kohlenstoffen dargestellt. Grafik erstellt mittels PyMOL.

Weitere Analoga des 3-Amidinophenylalanin-Typs wurden durch Substitution des Phenylsulfonylrings erhalten.

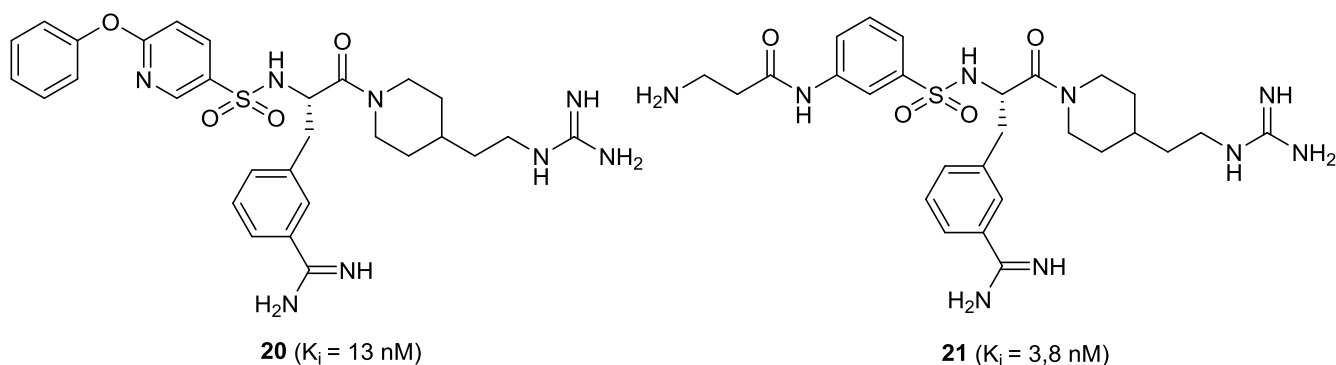


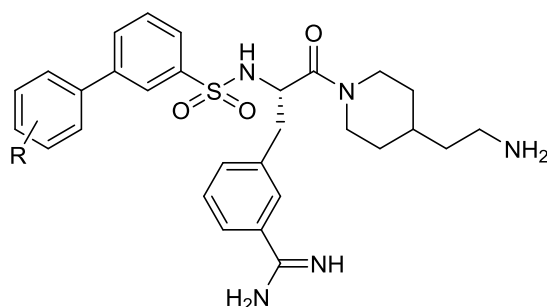
Abbildung 18: Weitere Hemmstoffe des 3-Amidinophenylalanin-Typs^[13].

Der tribasische Inhibitor **21** (Abbildung 18), bei dem ein β -Alanin über eine Amidbindung in meta-Position an den Phenylsulfonylrest gekuppelt wurde, hemmt Matriptase mit einem K_i -Wert von 3,8 nM und besitzt eine hohe Selektivität gegenüber Thrombin, FXa, uPA und Plasmin, die lediglich mit K_i -Werten $> 1 \mu\text{M}$ gehemmt werden. Der modellierte Komplex der Verbindung **21** in Matriptase^[72] zeigt eine Bindung der N-terminalen Aminogruppe in die S3/4-Tasche der Matriptase. Es wurde vermutet, dass dadurch zusätzliche Wasserstoffbrücken zwischen der Aminogruppe zu den Carbonylsauerstoffen des Peptidrückgrats in der S3/4-Tasche möglich sind und eventuell auch Kation- π -Interaktionen zwischen der protonierten Aminofunktion und den aromatischen Resten Trp215, Phe99 und

Phe97 ausgebildet werden^[72]. Durch diese Wechselwirkungen wurde die deutlich verstärkte Matriptasehemmung erklärt.

Tribasische Hemmstoffe wie Verbindung **21** sind sehr polar und daher nicht oral applizierbar. Für die Amidinofunktion wurden Prodrugstrategien entwickelt, um die orale Bioverfügbarkeit der Hemmstoffe zu verbessern. Bekannte Beispiele sind die Thrombininhibitor-Prodrugs Ximelagatran^[67] und Dabigatranetexilat^[73]. Die für Aminofunktionen verfügbaren Prodrugs, wie beispielsweise Amidderivate, sind deutlich stabiler, ihre enzymatische Umwandlung ist nur unzureichend und in seltenen Fällen möglich^[74-75]. Zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit wurde daher die N-terminale Aminofunktion des Inhibitors **21** durch ungeladene Reste ersetzt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Inhibitoren des 3-Amidinophenylalanin-Typs mit substituierten Biphenyl-3-Sulfonyl-Resten am N-Terminus^[72, 76].



Nr.	R	K _i (μM)
22	H	0,110
23	2-Cl	0,029
24	4-Cl	0,026
25	4-EtO	0,006
26	4-MeO	0,007
27	2,4-Cl ₂	0,002

Die Verbindung **22** mit einem unsubstituierten Biphenyl-3-Sulfonylrest am N-Terminus inhibiert Matriptase relativ schwach. Ihr K_i-Wert ist ca. 30-fach größer als der von Inhibitor **78**, ein weiterer Nachteil ist die geringe Selektivität gegenüber Thrombin. Durch eine Chlor-Substitution in ortho- oder para-Stellung am terminalen Phenylring erhöhte sich die Affinität gegenüber Matriptase um den Faktor 3 bis 4 (**22** vs. **23** und **24**). Eine Alkoxy-Substitution (**25**, **26**) bewirkte ebenfalls eine Verstärkung der Matriptasehemmung. Von Hammami^[76] wurden weitere Analoga dieses Typs wie Verbindung **27** (Abbildung 19) hergestellt, deren modellierter Bindungsmodus im aktiven Zentrum der Matriptase in Abbildung 20 gezeigt ist. Neben einer sehr starken Hemmwirkung gegenüber Matriptase besitzt die Verbindung **27** auch eine relativ hohe Selektivität gegenüber Thrombin und FXa.

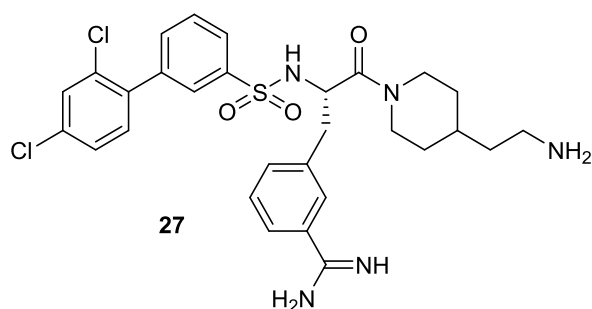


Abbildung 19: Struktur des Inhibitors **27** (K_i (Matriptase) = 0,002 μM , K_i (Thrombin) = 0,017 μM , K_i (FXa) = 0,049 μM)^[76].

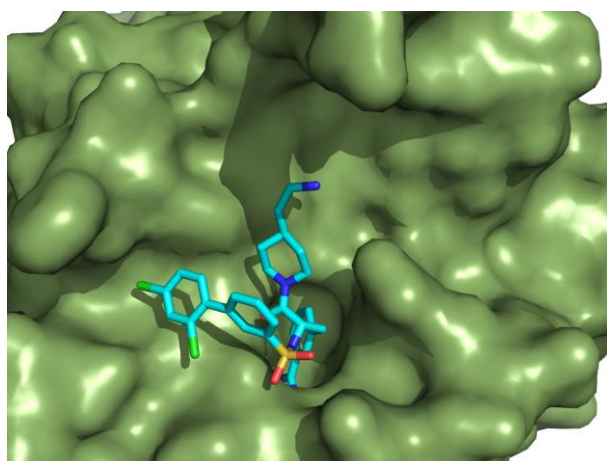


Abbildung 20: Modellierter Komplex des Inhibitors **27** (Kohlenstoffe hellblau, Chlor grün, Stickstoff blau, Sauerstoff rot, Schwefel gelb) im aktiven Zentrum der Matriptase, dargestellt mit grüner Oberfläche, (PDB: 2GV6). Die Grafik wurde durch Überlagerung der Matriptasestruktur 2GV6 und der Thrombinstruktur 4E7R im Komplex mit Inhibitor **27** und nachfolgender Löschung der Thrombins und des ursprünglichen enthaltenen Matriptaseinhibitors **18** mittels PyMOL erstellt.

Colombo et al^[11] veröffentlichten 2012 einen substratanalogen Matriptaseinhibitor, der auf der Aktivierungssequenz (Arg-Gln-Ala-Arg) vor dem Rest 16 der Proteasedomäne basiert und ein P1-P1'-Arginylnketonsegment besitzt (Abbildung 21).

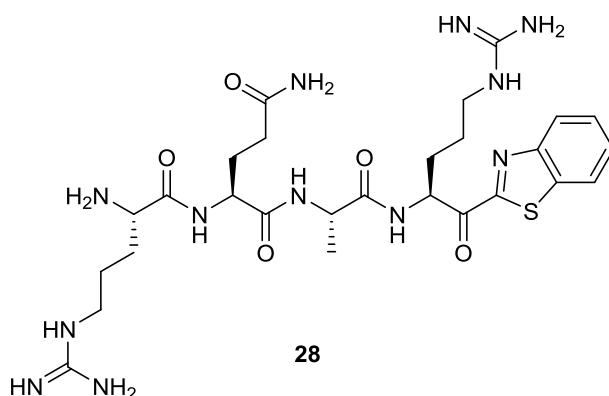


Abbildung 21: Substratanaloger Matriptasehemmstoff mit einem C-terminalen Arginylnketon-Segment^[11].

Die Verbindung **28** zeigt eine starke Matriptasehemmung mit einem K_i -Wert von 11 pM bei exzellenter Selektivität gegenüber einer Reihe verwandter trypsinartiger Serinproteasen (Tabelle 2).

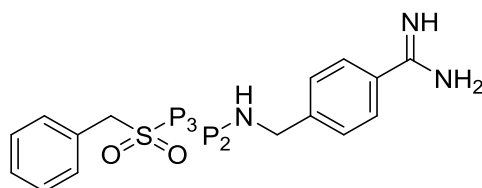
Tabelle 2: Hemmwirkung des Inhibitors **28** gegenüber Serinproteasen^[11].

Serinprotease	K_i (nM)	Selektivitätsfaktor $K_i / K_{i(\text{Mat.})}$
Matriptase	0,011	
Matriptase-2	3,3	300
Hepsin	1,1	100
TMPRSS11D	8,4	764
Trypsin	0,97	88
Thrombin	637	>30000
Furin	keine Hemmung bei 10 μM	

Die Verbindung **28** wurde von Zoratti^[77] auf ihre Eignung zur Tumorthherapie bei Brustkrebs getestet. Hierbei zeigte sich, dass der Inhibitor **28** schon in einer Konzentration von 100 nM in der Lage ist, die Proliferation der Zelllinien BT20, HCC1937 und SUM229 effektiv zu hemmen.

Neben den bereits beschriebenen Hemmstoffen des 3-Amidinophenylalanin-Typs wurden basierend auf früheren Arbeiten (siehe Abbildung 13) in der AG Steinmetzer auch eine Reihe weiterer subtratanaloger Hemmstoffe mit einem C-terminalen 4-Amidinobenzylamid-Rest (4-Amba) untersucht. Substanzen dieses Typs sind relativ starke Hemmstoffe vieler trypsinartiger Serinproteasen wie Thrombin, FXa, FVIIa, uPA und Plasmakallikrein^[23, 66-67, 69]. Eine Reihe von Verbindungen dieses Typs^[78-80] wurde auf ihre Eignung als Matriptasehemmstoffe untersucht und zusätzlich mit den verwandten Enzymen Thrombin und FXa getestet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Inhibierung von Matriptase, Thrombin und FXa durch substratanaloge Inhibitoren mit C-terminalem 4-Amidinobenzylamid-Rest^[78-80].



Nr.	P3	P2	K _i (μM)		
			Matriptase	Thrombin	FXa
29	D-hPhe	Pro	0,013	0,001	0,014
30	D-hArg	Pro	0,03	0,0004	0,003
31	D-Arg ^a	Pro	0,033	0,004	0,0029
32	D-Lys	Pro	0,04	0,001	0,052
33	D/L-hAla(2Pyr) ^b	Pro	0,073	0,001	0,0022
34	D-Lys(Cbz)	Pro	0,2	0,0004	0,017
35	D-Phe(4-Am) ^c	Pro	0,3	0,003	0,15
36	D-Cha ^{a,d}	Pro	0,33	0,0001	0,035
37	D-Phe	Pro	0,34	0,0001	0,077
38	D-Val	Pro	0,77	0,0013	0,012
39	D-Ala	Pro	2,76	0,005	0,83

^a [78]

^b racemisches D/L-h-2(Pyridyl)alanin

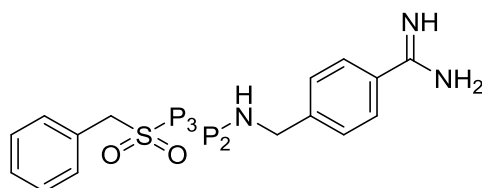
^c D-4-Amidionophenylalanin

^d D-Cyclohexylalanin

Bis auf die racemische Verbindung **33** besitzen die Verbindungen **29** bis **39** alle einen P3-Rest in D-Konfiguration^[78-80]. Obwohl einige der getesteten Substanzen mit Prolin in Position P2 eine starke Hemmwirkung gegenüber Matriptase zeigten, sind diese Substanzen deutlich stärkere Thrombin- und in den meisten Fällen auch bessere FXa-Hemmstoffe.

Der Einbau basischer Aminosäuren in P3-Position substratanaloger Inhibitoren führt ebenfalls zur einer relativ starken Matriptasehemmung, vermutlich tragen Kation- π -Interaktionen zwischen der P3-Seitenkette und den Matriptaseresten Phe99 und Trp215 zur Inhibierung bei. Daher wurden in einer weiteren Serie D-Arg in Position P3 konstant gehalten und der P2-Rest variiert (Tabelle 4). Die hierbei untersuchten Verbindungen waren aus früheren Arbeiten zur Hemmung der Protease HAT^[79, 81] in der AG Steinmetzer verfügbar. Hierbei zeigte sich, dass Inhibitor **40** mit einem Ala in P2-Position im Vergleich zu dem Prolin-Analogon **31** eine etwa 1,5-fach stärkere Hemmwirkung gegenüber Matriptase besitzt. Zusätzlich wurde durch den Ersatz von Pro durch Ala die Hemmwirkung gegen Thrombin deutlich reduziert, jedoch die Affinität für FXa leicht verstärkt. Verbindung **41**, mit Arg in P2-Position, zeigt eine ähnlich starke Matriptasehemmung wie Verbindung **40**, alle anderen in Tabelle 4 gezeigten Verbindungen sind schwächer wirksam.

Tabelle 4: Inhibierung von Matriptase, Thrombin und FXa durch substratanaloge Inhibitoren mit C-terminalem 4-Amidinobenzylamid-Rest^[78-80].



Nr.	P3	P2	K _i (μM)		
			Matriptase	Thrombin	FXa
40	D-Arg	Ala	0,02	0,075	0,0014
41	D-Arg	Arg	0,023	0,18	0,015
42	D-Arg	Abu ^a	0,065	0,029	0,0021
43	D-Arg	Nva ^b	0,12	0,068	0,037
44	D-Arg	Ser	0,2	0,5	0,02
45	D-Arg	Leu	0,46	0,037	0,011
46	D-Arg	Val	0,57	0,66	0,021
47	D-Arg	Phe	0,24	0,31	0,015

^a α-Aminobuttersäure

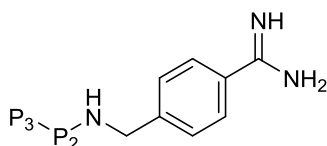
^b Norvalin

Die Affinität substratanaloger Inhibitoren gegenüber FXa kann durch Anwesenheit eines P4-Benzylsulfonylrestes verstärkt werden. So war aus früheren Arbeiten bekannt, dass durch Entfernen des P4-Restes in Bzls-D-Ser(tBu)-Gly-4-Amba die Affinität gegenüber FXa um den Faktor 1000 sinkt, die Thrombinhemmung jedoch nur 6-fach schwächer wurde^[82].

Um die FXa-Hemmwirkung zu reduzieren, wurden substratanaloge Hemmstoffe ohne P4-Rest hergestellt, obwohl zu vermuten war, dass diese Modifizierung auch zu einer Abschwächung der Matriptaseaffinität führt. Aufgrund der starken Matriptasehemmung durch Inhibitor **29** (MI-320) wurden in dieser Serie vor allem unterschiedlich substituierte D-Homophenylalanin-Derivate (Tabelle 5) als P3-Reste eingebaut.

Der Vergleich des Benzylsulfonyl-Derivats **29** (Tabelle 3) mit dem ungeschützten Inhibitor **48** zeigt, dass die Eliminierung des P4-Restes die Hemmwirkung gegen Matriptase lediglich um den Faktor 4 senkt, wohingegen die FXa-Affinität ca. 200-fach schwächer wird. Der Verzicht auf den P4-Benzylsulfonylrest in Kombination mit dem Einbau von Alanin in P2-Position führte zu den Hemmstoffen **49** und **50** (Tabelle 5), welche die ersten substratanaloge Verbindungen waren, die Matriptase stärker als FXa oder Thrombin hemmen^[83].

Tabelle 5: Inhibierung von Matriptase, Thrombin und FXa durch substratanaloge Inhibitoren mit einem C-terminalen 4-Amba-Rest^[83].



Nr.	P3	P2	K _i (μM)		
			Matriptase	Thrombin	FXa
51	H-hPhe	Pro	19,65	7,61	66,36
52	H-Phe	Pro	46,4	17,64	212,31
53	H-D-Phe ^a	Pro	3,89	0,004	37,53
48	H-D-hPhe	Pro	0,06	0,072	2,58
54	H-D-Arg	Pro	0,25	0,69	0,74
49	H-D-hPhe	Ala	0,044	0,73	1,79
50	H-D-hTyr	Ala	0,026	0,30	0,57

^a Verbindung **53** wurde bereits früher als Thrombininhibitor beschrieben^[66].

Die Hemmung der Matriptase bewirkt auch eine Inhibierung der proteolytischen Kaskade, die zur Aktivierung des KLK7 führt^[84]. Die Protease KLK7, die als weitere Zielstruktur im Rahmen dieser Arbeit diente und ebenso wie die bereits beschriebene Matriptase eine Rolle bei Erkrankungen epithelialer Gewebe spielt, wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

1.2 Kallikrein 7

Im Gegensatz zu Matriptase ist Kallikrein 7 eine Serinprotease mit chymotrypsinartiger Spezifität, die ursprünglich aus dem Stratum Corneum isoliert wurde und an der Abschuppung der obersten Hautschicht beteiligt ist^[85]. Die Protease wurde daher zunächst als *stratum corneum chymotryptic enzyme* (SCCE) bezeichnet. Die Lokalisierung des Gens in einem Cluster von insgesamt 15 Kallikrein-Genen auf dem Chromosom 19 und die hohe Sequenzhomologie zu anderen Kallikreinen führte jedoch zu einer Umbenennung der Protease in Kallikrein 7, nachfolgend KLK7 genannt.

KLK7 ist nicht nur in der Haut zu finden, sondern wird auch in Speiseröhre, Herz, Leber, Niere, Bauchspeicheldrüse, Brustdrüse und Speicheldrüse in relativ hoher Menge exprimiert^[86-87].

Zahlreiche Erkenntnisse zur Funktion des KLK7 kommen aus Untersuchungen zur Homöostase der Haut, wo KLK7 Teil einer Aktivierungskaskade ist, die für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut notwendig ist^[88-89].

1.2.1 Substratspezifität

Die ersten Erkenntnisse zur proteolytischen Aktivität von KLK7 stammen aus Untersuchungen von Egelrud et al.^[85], in denen erkannt wurde, dass das Enzym das Substrat MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA zügig, das Substrat H-D-Ile-Pro-Arg-pNA jedoch nur langsam umsetzt. Die bevorzugte Spaltung C-terminal aromatischer Reste wies auf eine chymotrypsinartige Substratspezifität hin. Dies wurde kurze Zeit später mit natürlichen Substraten bestätigt^[90], als gezeigt wurde, dass KLK7 die β -Kette von Rinderinsulin hinter aromatischen Resten spaltet.

Debela et al.^[91] bestätigten die chymotrypsinartige Spezifität des KLK7. In Position P1 wird Tyrosin deutlich bevorzugt, wobei überraschenderweise Substrate mit dem strukturell sehr ähnlichen Phenylalanin sogar schlechter als Verbindungen mit Alanin, Methionin oder Norleucin (Nle) gespalten werden. Das voluminöse Tryptophan wird in P1-Position fast nicht akzeptiert. Wahrscheinlich gibt es sterische Probleme aufgrund des relativ großen Indolrings, wie durch die Überlagerung einer Chymotrypsinstruktur mit einem P1-Trp-Substrat^[92] und einer KLK7-Struktur gezeigt wurde^[91]. In Position P2 ist ebenfalls Tyrosin bevorzugt, mit deutlichem Abstand gefolgt von Leu, Nle, Thr, Met und Phe. Die Taschen S3 und S4 akzeptieren fast alle Aminosäuren, wobei eine leichte Präferenz für größere hydrophobe Resten existiert.

1.2.2 Struktur

Das reife KLK7-Molekül besitzt eine ellipsoide Form mit den ungefähren Maßen von $48 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA} \times 35 \text{ \AA}$ ^[93] und ist in Abbildung 22 im Komplex mit dem irreversiblen Inhibitor Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-CMK (**55**) gezeigt.

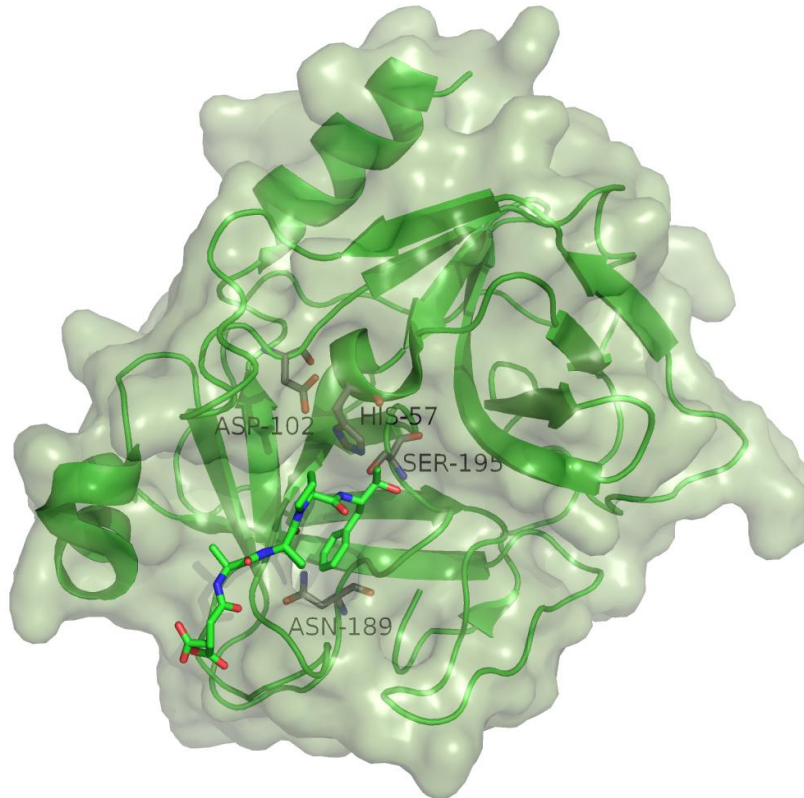


Abbildung 22: Komplex des Inhibitors **55** (Kohlenstoffe grün, Stickstoff blau, Sauerstoff rot) im aktiven Zentrum des KLK7 (dargestellt mit hellgrüner, transparenter Oberfläche, PDB: 2QXI). Das Rückgrat des Inhibitors ist als Cartoon gezeigt, die β -Faltblätter des Enzyms sind hierbei als Pfeile dargestellt. Von KLK7 sind die Reste His57, Asp102 und Ser195 der katalytischen Triade sowie das Asn189 am Boden der S1-Tasche gezeigt (Kohlenstoffe grau, Stickstoff blau, Sauerstoff rot). Die P1'-Methylen-Gruppe von **55** ist kovalent an das N ϵ von His57 gebunden, darüber hinaus existiert eine Hemiketalbindung zwischen dem P1-Carbonyl-C und dem O γ des Ser195.

Wie andere Proteasen der S1-Familie besteht KLK7 aus zwei 6-strängigen β -Barrels (Abbildung 22), die durch drei Segmente verbunden sind. Die katalytische Triade befindet sich an der Verbindungsstelle beider Barrels, ebenso wie der S1-S4-Substratbindungsbereich. Die Sequenz des KLK7 ähnelt der von KLK5^[94]. Im Vergleich zu KLK4 und KLK6 gibt es Unterschiede im Bereich der 148er-Schleife^[91] (Abbildung 23), die bei KLK7 um zwei Reste verlängert ist. Eine weitere Besonderheit des KLK7 liegt im Bereich des Loops zwischen den Resten 70 bis 80, der bei KLK7 um zwei bis drei Reste kürzer als bei den meisten anderen Kallikreinen ist.

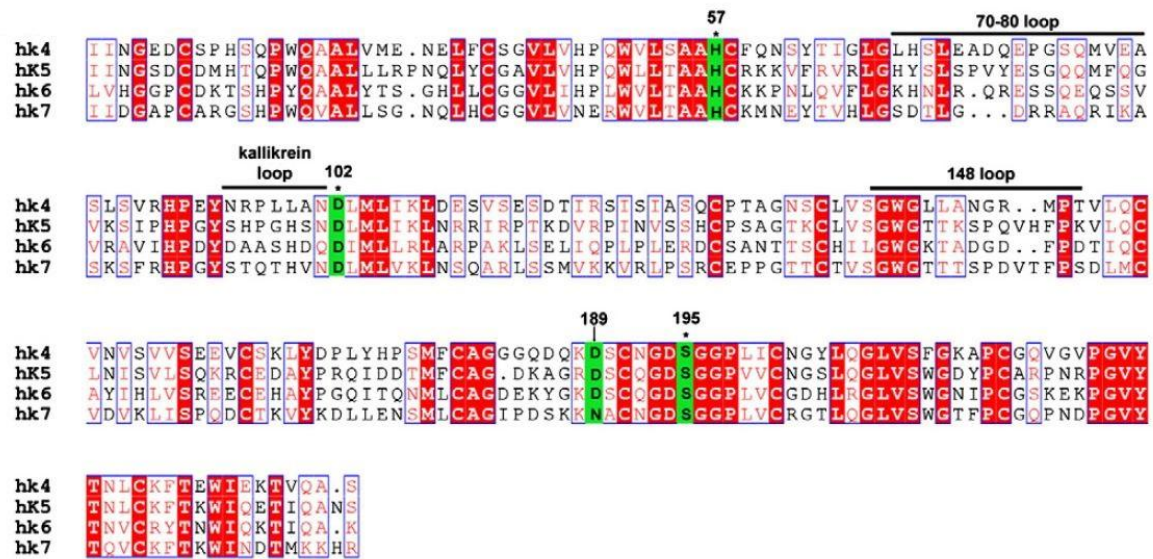


Abbildung 23: Vergleich der Sequenzen der Kallikreine 4 bis 7. Grafik modifiziert nach^[93].

Aktuell sind sechs Kristallstrukturen für KLK7 in der PDB hinterlegt, eine Struktur des Apoenzyms, vier Strukturen im Komplex mit irreversibel bindenden Chlormethylketon-Derivaten sowie eine Struktur mit dem reversibel bindenden Inhibitor **56** (Abbildung 24). In Tabelle 6 sind die PDB-Codes und die Strukturen der verwendeten Inhibitoren zusammengefasst.

Tabelle 6: Verfügbare KLK7-Strukturen

PDB-Code	Auflösung	Inhibitor	Literaturstelle
2QXG	2,6 Å	AAF-CMK	[94]
2QXH	2,0 Å	Suc-AAPF-CMK (55)	[94]
2QXI	1,0 Å	Suc-AAPF-CMK	[94]
2QXJ	2,1 Å	Suc-AAPF-CMK und Cu ²⁺	[94]
3BSQ	2,8 Å	ohne	[93]
5FAH	1,1 Å	56	[95]

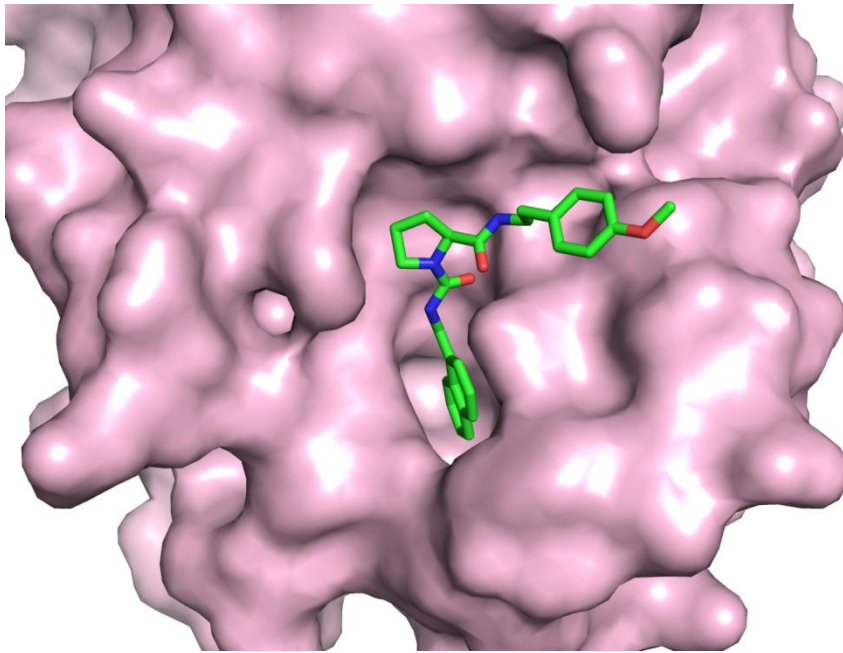


Abbildung 24: Komplex des Inhibitors **56** (Kohlenstoffe grün, Stickstoff blau, Sauerstoff rot) im aktiven Zentrum von KLK7 (dargestellt mit pinkfarbener Oberfläche, PDB: 5FAH)^[95].

Die Sequenz der schweren Kette des reifen KLK7 beginnt mit Ile16, dessen N-terminale Aminogruppe an die Seitenkette des Asp194 bindet^[94]. Die Bildung dieser Salzbrücke führt zur korrekten Ausbildung des aktiven Zentrums mit dem Oxyanion-Loch und der frei zugänglichen S1-Tasche^[96]. Die Sequenz des aktiven Enzyms besitzt das für Kallikreine typische cis-Pro219^[97] und sechs intramolekulare Disulfidbrücken. Wie bereits oben beschrieben, ist der KLK-Loop zwischen den Resten 70 bis 80 um zwei Reste kürzer und damit auch kompakter als bei den meisten anderen Kallikreinen. An der Oberfläche des aktiven Enzyms befinden sich zwei große positiv geladene Bereiche, die an die funktionell wichtigen Anionbindungsstellen an der Oberfläche des Thrombins erinnern^[98]. Der erste dieser Bereiche in der Nähe des 70 bis 80-Loops wird von den Resten Arg78, Arg79, Arg82 und Arg113 gebildet. Die zweite Stelle befindet sich nahe der C-terminalen Helix und wird von Arg246, His245, Lys244, Lys243, Lys236 und den Resten Lys33 und His91 umgeben. Beide positive Regionen sind durch eine Reihe weiterer basischer Reste (Lys84, Lys87, Lys107, Lys59 und Arg90) beinahe verschmolzen, nur Glu62 besitzt eine negative Ladung. Es ist denkbar, dass die Aufgabe dieser positiv geladenen Bereiche in der Bindung saurer Substratsequenzen liegt.

Die katalytische Triade besteht wie üblich aus den Resten Ser195, His57 und Asp102, das Oxyanion-Loch wird von den Amid-Stickstoffen von Gly193 und Ser195 gebildet. Die S1-Tasche, die von den konservierten Segmenten Ala190-Ser195, Val213-Cys220 und Pro225-Tyr228 umgeben wird, ist in ihrer Form etwas größer als die von KLK1 und KLK4^[99]. Dennoch ähnelt sie grundsätzlich in ihrer Form der S1-Bindungstasche der beiden genannten trypsinartigen Kallikreine mit dem nach außen gestülpten 217-220-Loop, wobei das Carbonyl von Thr217 in Richtung der S1-Region und das Carbonyl von Phe218 von dieser weg zeigt, bedingt durch das cis-Prolin in Position 219^[94]. Eine Besonderheit des KLK7 im Vergleich zu

den trypsinartigen Kallikreinen ist der Ersatz des Asp189 am Boden der S1-Tasche durch Asn189. Anschließend kommt bei KLK7 der Rest Ala190, wodurch der mittlere Bereich der S1-Tasche im Vergleich zu vielen anderen Kallikreinen mit einem Ser190 etwas hydrophober ist. Der Eingang der S1-Tasche wird bei KLK7 durch die Seitenketten von Phe218 und Asn192 begrenzt. Die S1-Tasche des KLK7 ist recht weit, aber nicht so tief wie bei Chymotrypsin ausgeprägt, welches ein Ser189 am Boden besitzt. Daher ist KLK7 für die Aufnahme von Resten mit mittelgroßen und größeren Seitenketten wie Tyr geeignet, akzeptiert jedoch auch Ala und Leu^[91].

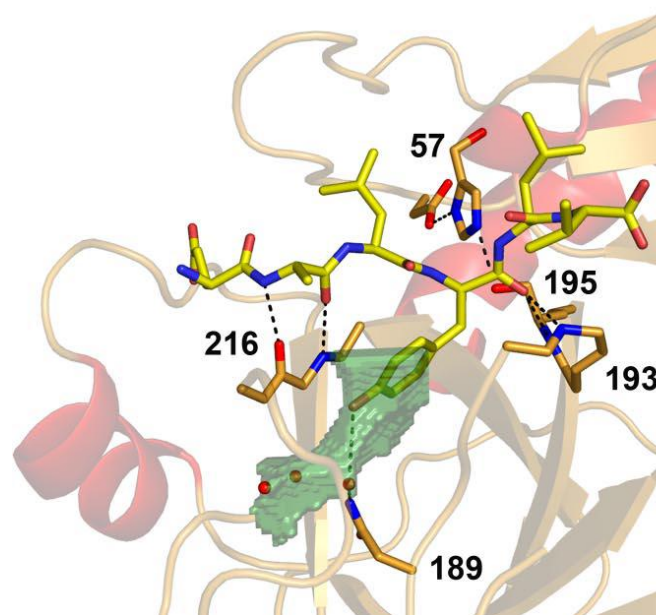


Abbildung 25: Modellierter Bindungsmodus des Peptids H-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-OH (Kohlenstoffe gelb, Stickstoffe blau, Sauerstoffe rot) im aktiven Zentrum des KLK7. Die S1-Tasche ist in grün markiert, Wassermoleküle sind als rote bzw. orangene Kugeln dargestellt. Grafik entnommen aus^[94].

Abbildung 25^[94] zeigt den modellierten Bindungsmodus des Substrates H-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val im aktiven Zentrum des KLK7. Die phenolische Seitenkette des P1-Tyr ist in die S1-Tasche (grün) gerichtet und die Hydroxylgruppe wechselwirkt möglicherweise über ein verbrückendes Wassermolekül mit der Amidseitenkette des Asn189.

Die recht flache S2-Tasche des KLK7 wird wie bei uPA von den Seitenketten der Reste His57 und His99 begrenzt, was auf eine Präferenz für eher kleine bis mittelgroße hydrophobe Reste hindeutet, jedoch wird auch Tyr bereitwillig akzeptiert^[91]. Die S3/4-Tasche wird am Boden durch Trp215, auf der rechts von His99 und auf der linken Seite von Leu175 begrenzt^[94].

1.2.3 Aktivierung

KLK7 wird nach Abspaltung des Signalpeptides als inaktives Zymogen (pro-KLK7) von den Zellen des Stratum granulosum im Raum zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum gebildet^[100].

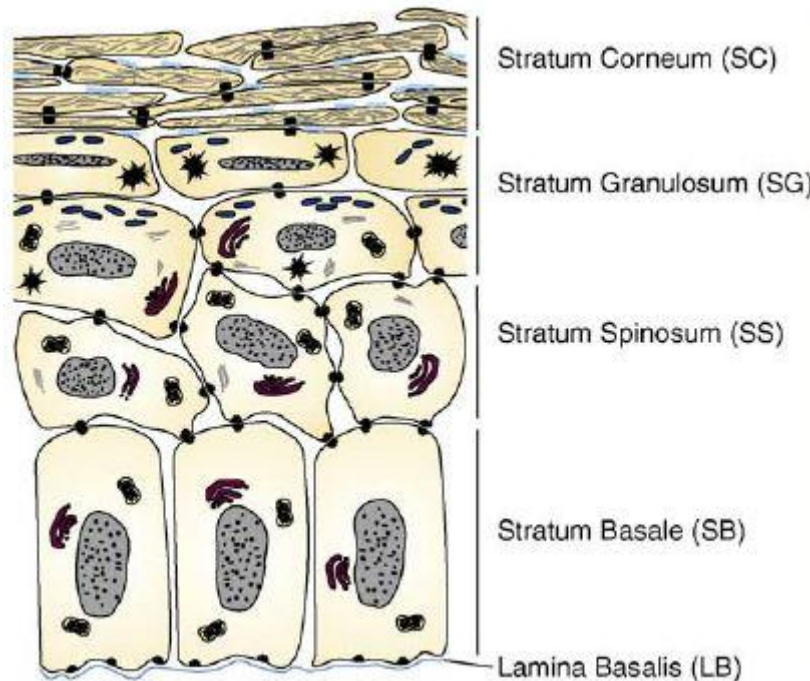


Abbildung 26: Die Epidermis der Haut ist aus mehreren Schichten aufgebaut^[88]. Das Stratum basale (SB) besteht aus undifferenzierten Keratinocyten, die an die Lamina basalis gebunden sind. Im Stratum spinosum beginnt die Differenzierung der Keratinocyten, welche im Stratum granulosum abgeschlossen ist. Das Stratum corneum, die äußerste Hautschicht, besteht aus abgestorbenen Zellen. Grafik entnommen aus^[88].

Im Raum (Abbildung 26) zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum^[100] kommt es zur Zymogenaktivierung durch proteolytische Spaltung N-terminal vor Ile16 (Abbildung 23 und Tabelle 7) hinter einem Lysin-Rest im Rahmen einer Aktivierungskaskade (Abbildung 27) durch das trypsinartige KLK5^[100-102], welches wiederum autoproteolytisch aktiviert wird. KLK5 kann ebenso die Zymogenformen des KLK8 und KLK14 aktivieren und wird in einem Feedback-Mechanismus auch selbst wieder durch KLK14 aus seinem Zymogen in die aktive Form überführt, wobei die Spaltung zirka 50-fach effektiver als die Autoaktivierung ist^[89].

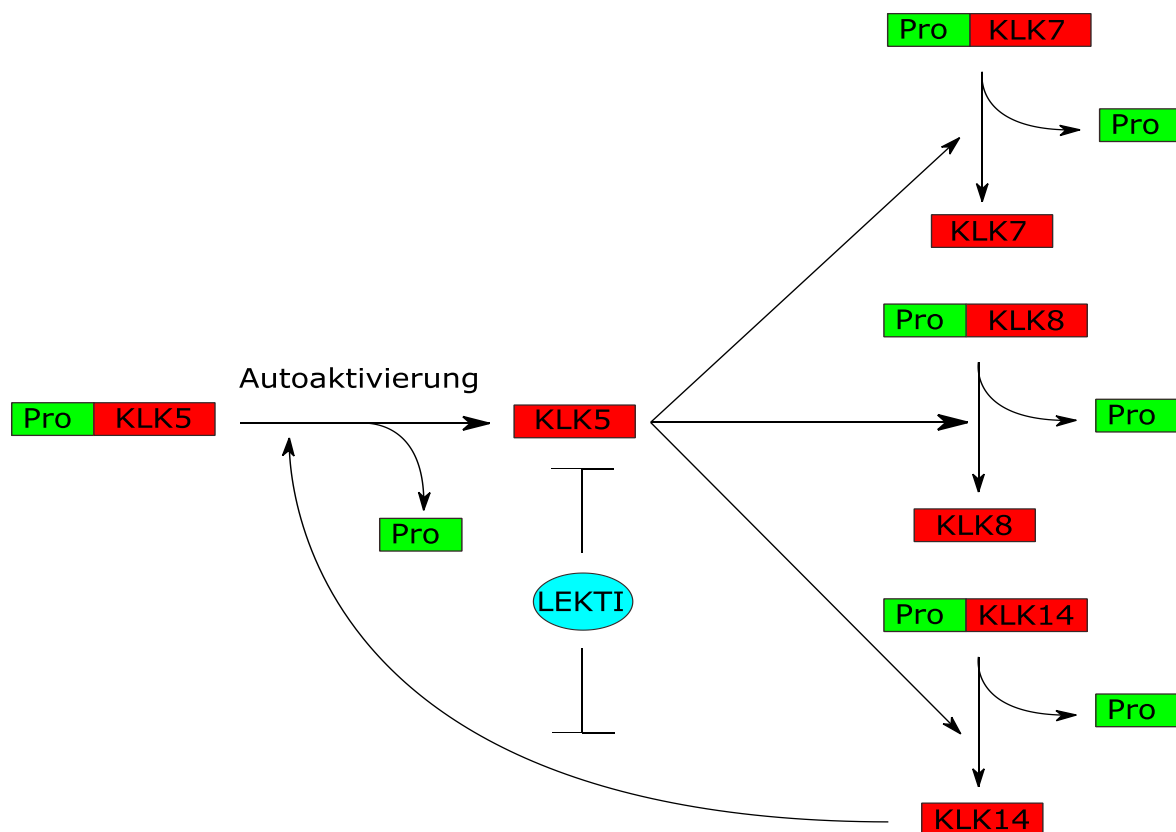


Abbildung 27: Aktivierung des KLK7 im Rahmen einer Aktivierungskaskade. KLK5 ist nach Autoaktivierung in der Lage, die Zymogene der Kallikreine 7, 8 und 14 zu aktivieren. KLK14 kann in einem Feedback-Loop weiteres KLK5 generieren. Der Inhibitor LEKTI ist in der Lage, direkt KLK5, aber auch dessen Aktivierung durch KLK14 zu hemmen (Grafik erstellt nach^[100]).

Nach Aktivierung startet die reife KLK7-Sequenz N-terminal mit dem Rest Ile16 (Chymotrypsin-Nummerierung), dessen N-terminale Aminogruppe in üblicher Weise eine Salzbrücke zur Seitenkette des Asp194 neben dem katalytisch wirksamen Ser195 ausbildet^[94] und somit das aktive Zentrum öffnet und stabilisiert.

Tabelle 7: Spaltstellen ausgewählter Kallikrein-Zymogene vor dem Rest 16. Modifiziert nach^[89].

Zymogen	Sequenz der Aktivierungsstelle
pro-KLK5	Ser-Asp-Asp-Ser-Ser-Ser-Arg↓Ile16-Ile-Asn-Gly
pro-KLK7	Glu-Glu-Ala-Gln-Gly-Asp-Lys↓Ile16-Ile-Asp-Gly-Ala
pro-KLK14	Gln-Glu-Asp-Glu-Asn-Lys↓Ile16-Ile-Gly-Gly

Die Aktivierung des pro-KLK 7 C-terminal einer basischen Aminosäure lässt vermuten, dass auch weitere trypsinartige Serinproteasen das Zymogen aktivieren können.

1.2.4 Biologische Funktion

Die wesentliche Rolle des KLK7 liegt in der Aufrechterhaltung der Homöostase der Haut. Das Enzym spaltet in den Corneodesmosomen, zellverbindenden Strukturen des Stratum corneum, die adhäsiven Proteine Corneodesmosin und Desmocollin 1^[103]. Hierdurch, sowie durch Spaltung der an der Lipidbiosynthese beteiligten Enzyme Sphingomyelinase und β -Glucocerebrosidase^[104], trägt das Enzym zur kontrollierten Abschuppung der Haut^[102, 105-106] und somit auch zu ihrer kontrollierten Regeneration^[103] bei.

Tabelle 8: Physiologische Substrate des KLK7.

Substrat	Aufgabe	Literatur
Corneodesmosin	Adhäsives Protein, Inaktivierung durch KLK7	[102, 105-106]
Desmocollin 1	Adhäsives Protein, Inaktivierung durch KLK7	[102, 105-106]
E-Cadherin	Adhäsives Protein, Inaktivierung durch KLK7	[107]
Saure Sphingomyelinase	Lipidbiosynthese, Desaktivierung durch KLK7	[104, 108]
β -Glucocerebrosidase	Lipidbiosynthese, Desaktivierung durch	[104, 108]
pro-IL-1 β	Vorstufe von IL-1 β , Aktivierung durch KLK7	[109-110]
LL-37	Antimikrobielles Peptid, Aktivierung durch KLK7	[111]

1.2.5 Funktion bei Erkrankungen

Ein fein reguliertes Gleichgewicht zwischen Bildung neuer Corneocyten (Hornzellen) und der Abschuppung ist für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Haut essentiell. Eine Desregulation führt zu einer gestörten Funktion der Haut und letztlich zu einer Reihe von Erkrankungen wie dem Netherton-Syndrom^[112] und atopischer Dermatitis^[113], in denen ihre natürliche Barrierefunktion beeinträchtigt ist. In gesunder Haut wird dieses Gleichgewicht durch endogene Proteaseinhibitoren wie LEKTI (*lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor*)^[114-116] aufrechterhalten. Das Fehlen dieser Inhibitoren, aber auch eine erhöhte Expression des KLK7, führt bei diesen Erkrankungen zu einer erhöhten Hautabschuppung^[117-118].

KLK7 kann auch Entzündungsreaktionen in der Haut verstärken, indem es das antimikrobielle und pro-inflammatorische Peptid LL-37^[111], ebenso wie pro-IL-1 β , den Vorläufer des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β ^[109-110], aktiviert.

1.2.5.1 Netherton-Syndrom

Das Netherton-Syndrom (NS) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Hautkrankheit, die durch veränderte Abschuppung, Entzündungsreaktionen, beeinträchtigte Keratinisierung, fehlerhafte Haarbildung und gestörte Barrierefunktion der Haut gekennzeichnet ist^[112]. Darüber hinaus kommt es durch erhöhte Expression von IL-1 β , welches durch KLK7 aktiviert wird, und durch die erhöhte Expression von pro-allergischen Mediatoren wie TARC (*thymus and activation regulated chemokine*) und MDC (*macrophage-derived chemokine*) zu schweren Entzündungen und einer Neigung zu allergischen Reaktionen^[112].

Die Krankheit wird durch Mutationen im Gen SPINK5 verursacht, das für den Proteaseinhibitor LEKTI-1 kodiert. Studien im Mausmodell und bei NS-Patienten zeigten, dass Defizite bei LEKTI-1 zu einer stark erhöhten Aktivität der Proteasen KLK5 und KLK7 führen. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Hautabschuppung, da adhäsive Proteine wie Corneodesmosin und Desmocollin (Tabelle 8) verstärkt gespalten werden. Der Verlauf der Krankheit ist in der Regel schwerwiegend und kann besonders bei Neugeborenen und Kleinkindern lebensbedrohlich sein^[119], da es zu einer starken Dehydratisierung der Haut kommt. In der Regel verbessert sich der Zustand der Patienten, wenn sie das Erwachsenenalter erreichen^[112].

1.2.5.2 Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis (AD), auch als Neurodermitis bekannt, ist eine verbreitete chronische Hautkrankheit, die durch entzündete und sich oft verdickende Bereiche innerhalb der Haut, durch allergische Reaktionen, aber auch durch eine Anfälligkeit der betroffenen Patienten für asthmatische Erkrankungen^[120-122] gekennzeichnet ist. Diese Erkrankung kann aufgrund einer gestörten Barrierefunktion der Haut entstehen^[113, 123-124], wobei die Ursache dafür in einer erhöhten Expression der Kallikreine liegen kann^[88]. Es wurden erhöhte Level der Kallikreine im Stratum corneum bestimmt^[118], eine deutlich verringerte Expression des Gens SPINK5 festgestellt, das für den Inhibitor LEKTI kodiert^[125], und ein erhöhter pH-Wert der Haut^[126] gemessen. Durch die erhöhten KLK-Aktivitäten kommt es in der Folge zu einer gestörten Homöostase der Haut, bedingt durch die gesteigerte Spaltung und Inaktivierung adhäsiver Proteine.

1.2.5.3 Krebserkrankungen

Krebserkrankungen können sich durch Metastasierung auf den gesamten Körper ausbreiten. Voraussetzung für die Metastasierung ist ein Verlust der interzellulären Adhäsion zwischen den Zellen des Primärtumors^[127-128]. Eine Ursache dafür kann die erhöhte Expression von extrazellulären Proteasen wie KLK7 sein, die adhäsive Proteine (Tabelle 8) spalten und dadurch das Streuen der Tumorzellen ermöglichen. Neben den bereits in Tabelle 8 beschriebenen adhesiven Proteinen Corneodesmosin und Desmocollin-1 wird auch Fibronectin gespalten, ein Protein der extrazellulären Matrix^[129].

KLK7 kann an verschiedenen Krebserkrankungen beteiligt sein wie Brustkrebs^[130], Eierstockkrebs^[131], Gebärmutterhalskrebs^[132], Bauchspeicheldrüsenkrebs^[133] und

Prostatakrebs^[134]. Jedoch existieren Unterschiede bei der Expression des KLK7 zwischen verschiedenen Krebsarten. Bei Eierstockkrebs^[135], Hirntumoren^[136], Darmkrebs^[137-138], Gebärmutterhalskrebs^[139] und Plattenepithelkarzinomen^[140] ist KLK7 hochreguliert, bei Hautkrebs^[141], Prostatakrebs^[142] und Lungenkrebs^[143] jedoch herabreguliert. Da KLK7 in einer Reihe von Krebserkrankungen erhöht exprimiert wird, ist diese Protease sowohl ein möglicher Biomarker^[144] für die Früherkennung, aber auch ein potentiell Target für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente.

1.2.6 Hemmstoffe des KLK7

Da die Kallikreine eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen spielen, muss ihre Aktivität fein reguliert sein. Zu hohe KLK-Aktivitäten können jedoch Nebenwirkungen auslösen. In solchen Fällen könnte eine Reduktion der Enzymaktivitäten durch selektive Inhibitoren neue Therapiemöglichkeiten eröffnen.

Ein Großteil der natürlich verfügbaren KLK7-Inhibitoren bindet direkt an das aktive Zentrum der Protease. Viele inhibitorisch wirksame Moleküle besitzen strukturelle Ähnlichkeiten mit den natürlichen Substraten und können gleichzeitig mehrere Bindetaschen besetzen. Denkbar ist auch die Entwicklung allosterischer Inhibitoren, die Exosites adressieren und in der Regel eine Konformationsänderung des aktiven Zentrums auslösen, wodurch der Zugang der Substrate verhindert oder zumindest erschwert wird.

Es sind mehrere endogene Kallikrein-Inhibitoren bekannt^[145], wobei die Bandbreite von einzelnen Metallionen bis hin zu Molekülen von mehreren 100 kDa reicht. Meistens kommt es zu einer reversiblen Bindung der Inhibitoren, jedoch gibt es auch irreversible Hemmstoffe, die KLK7 kovalent angreifen.

1.2.6.1 Natürliche Inhibitoren

Hemmung durch Metallionen

Eine Reihe von Serinproteasen erfordern eine Aktivierung durch im Körper vorkommende Kationen, Beispiele sind die Stimulation der prokoagulatorischen Funktion des Thrombins durch Na^+ -Ionen oder die Aktivierung des Trypsins durch Ca^{2+} -Ionen^[98]. Eine Stimulation durch Kationen wurde auch für die Kallikreine 1, 3, 4, 6 und 8^[146-147] beobachtet, jedoch nicht für KLK7. Im Gegensatz dazu wurde für KLK7 eine Hemmwirkung durch Zn^{2+} -Ionen im niedrigen mikromolaren Bereich festgestellt^[94]. Es wurde ein K_i -Wert von 10 μM bestimmt, wobei die extrazelluläre Konzentration der Zn^{2+} -Ionen in der Haut ca. 15 μM beträgt^[94]. Dadurch ist eine leichte Hemmung des Enzyms durch die physiologischen Zn^{2+} -Konzentration in der Haut zu erwarten. Zusätzlich wurde eine Hemmung des KLK7 durch Cu^{2+} -Ionen mit einer Hemmkonstante von 0,6 μM beschrieben.

Es wird angenommen^[145], dass das Zn^{2+} -Ion KLK7 analog zu der in Abbildung 28c gezeigten Struktur hemmt. Ein weiterer Hinweis für diesen postulierten Bindungsmodus ist der Verlust der KLK7-Hemmung bei einer His99Ala-Mutante, die das Metallion offenbar nicht mehr binden kann^[145].

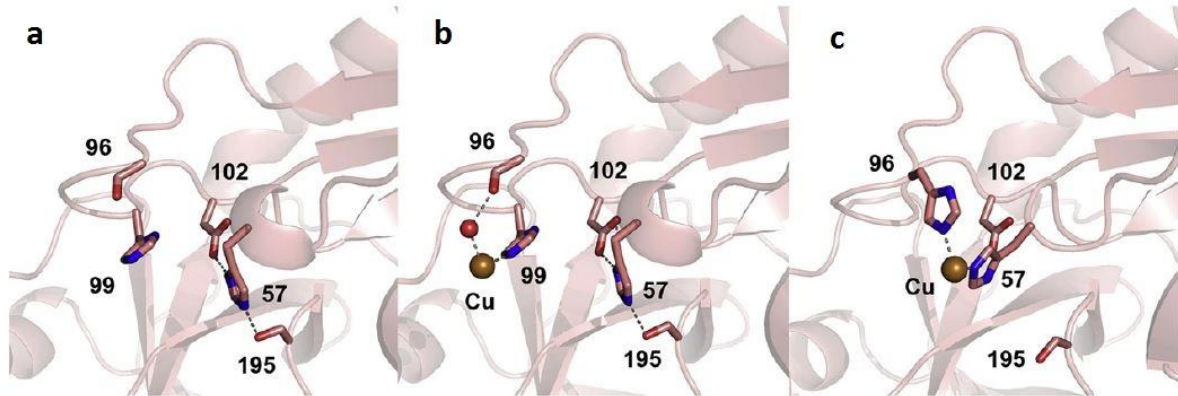


Abbildung 28: Ansicht der aktiven Zentren des KLK7 (a und b) und einer Trypsinmutante (c). (a) Darstellung der Seitenketten der Reste der katalytischen Triade (His57, Asp102 und Ser195) im aktiven Zentrum des KLK7, sowie die Seitenketten der Reste Ser96 und His99. (b) Ein Cu^{2+} -Ion (gelbe Kugel) kann im aktiven Zentrum des KLK7 an His99 und über ein verbrückendes Wassermolekül (rote Kugel) an die Seitenkette des Ser96 binden. (c) In einer Arg96His-Trypsin-Mutante wurde eine Komplexierung des Cu^{2+} -Ions durch His96 und His57 gefunden. Grafik modifiziert nach^[145].

Es wurde vermutet, dass trotz der Hemmung durch ein Zn^{2+} -Ion Substrate immer noch an KLK7 binden können, jedoch aufgrund der Komplexierung des His57 an das Metallion nicht mehr gespalten werden. Die Regulation der Aktivität des epidermalen KLK7 durch Zink könnte auch unter physiologischen Bedingungen bedeutsam sein. Interessanterweise bewirken Salben mit ZnO eine schnellere Wundheilung durch rascheren Aufbau der Hautschichten^[148], was möglicherweise neben anderen Ursachen auch an einer reduzierten KLK7-Aktivität liegen kann.

Hemmung durch endogene Inhibitoren

Neben Metallionen gibt es mehrere endogene Inhibitoren des KLK7, dazu gehören Hemmstoffe der Serpin-Familie oder vom Kazal-Typ, aber auch $\alpha 2$ -Makroglobulin.

Serpine (abgeleitet von *serine protease inhibitor*) sind Proteine mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 40 kDa, die etwa 10 % der Proteine innerhalb des Blutplasmas ausmachen^[149]. Die Hemmung durch die Serpine erfolgt nach einem speziellen Mechanismus. Nach substratanaloger Bindung und Spaltung zwischen den P1- und P1'-Resten in einem speziellen Loop und Bildung einer kovalenten Bindung zwischen der P1-Carbonylgruppe und dem Ser195 kommt es zu einer Umlagerung des Komplexes, was zu einer praktisch irreversiblen Hemmung des Enzyms führt^[150]. Obwohl aktuell keine Strukturen von Serpin-KLK7-Komplexen verfügbar sind, sind die Serpine die bisher am besten untersuchten endogenen Kallikreininhibitoren^[151]. Das Serpin $\alpha 1$ -Antitrypsin ($\alpha 1$ -AT) mit einem Met-Ser-

Segment in P1- und P1'-Position besitzt mit einem K_i -Wert von 3,9 μM eine moderate Hemmwirkung gegenüber KLK7, zeigt aber keine Inhibierung der trypsinartigen KLKs^[152-154]. Weitere gegenüber KLK7 wirksame Serpine sind der Protein C Inhibitor (PCI)^[152] und Kallistatin^[155].

LEKTI-1 (*lympho-epithelial kazal-type inhibitor*) ist ein aus 15 Domänen bestehender Inhibitor des Kazal-Typs^[156], der durch das Gen SPINK5 codiert ist. Wie bereits beschrieben, sind Mutationen dieses Gens für das Netherton-Syndrom und die Ausprägung der atopischen Dermatitis verantwortlich^[157]. Den durch Mutationen im SPINK5-Gen hervorgerufenen Varianten von LEKTI-1 fehlen verschiedene C-terminale Domänen, was mit erhöhten Konzentrationen und Aktivitäten mehrerer epidermaler KLKs einhergeht^[158].

NMR-Untersuchungen der Domänen 1 und 6 des LEKTI-1 zeigten, dass sich deren Struktur von anderen Inhibitoren des Kazal-Typs besonders im Bereich des reaktiven Loops unterscheidet. Diese Unterschiede sind durch das Fehlen einer dritten Disulfid-Brücke innerhalb dieser LEKTI-1-Domänen bedingt, lediglich 2 der 15 Domänen besitzen drei Verbrückungen^[159].

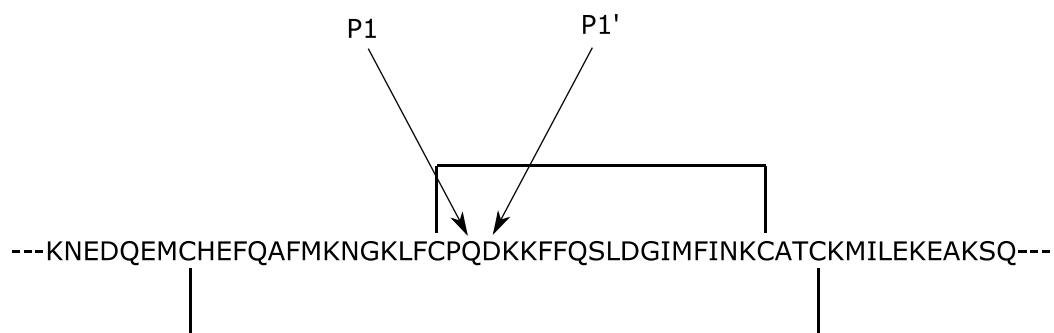


Abbildung 29: Reste 23 bis 77 der Domäne 1 des LEKTI-1 mit zwei Disulfidbrücken, die Spaltung durch KLK7 erfolgt zwischen den markierten Gln und Asp. Grafik erstellt nach^[159].

Domäne 1 des LEKTI-1 enthält eine Gln-Asp-Spaltstelle (Abbildung 29), die wahrscheinlich der Angriffspunkt für chymotrypsinartige Proteasen ist. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen an der isolierten Domäne 1 des LEKTI-1 bestätigt, die auch einzeln die Aktivität chymotrypsinartiger Proteasen in der Haut hemmen kann^[158]. Durch weitere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch die Domäne 6 von LEKTI-1 alleine in der Lage ist, KLK 5 und 7 zu inhibieren^[115]. Ein rekombinantes Fragment der Domänen 6-9 des LEKTI-1 inhibiert KLK7 mit einer Hemmkonstante von 11 nM^[114].

1.2.6.2 Synthetische Inhibitoren

Da erhöhte KLK7-Aktivitäten bei verschiedenen Erkrankungen beteiligt sein könnten, ist das Enzym ein interessantes Target für die Wirkstoffentwicklung. Zur Identifizierung erster Leitstrukturen können verschiedene Strategien genutzt werden, z.B. ein *high-throughput-screening* (HTS) bereits verfügbarer Substanzen oder ein virtuelles *in silico* Screening von Substanzdatenbanken. Häufig werden erste Leitstrukturen auch durch Derivatisierung bekannter Substratsequenzen gefunden.

Chlormethylketone (CMKs) sind irreversible Hemmstoffe von Serin – und Cysteinproteasen und ideale Hilfsmittel zum Kristallisieren und Bestimmen von Proteasestrukturen. Im Falle des KLK7 wurden erste Kristallstrukturen im Komplex mit H-Ala-Ala-Phe-CMK (**57**) und Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-CMK (**55**) erhalten (Abbildung 30).

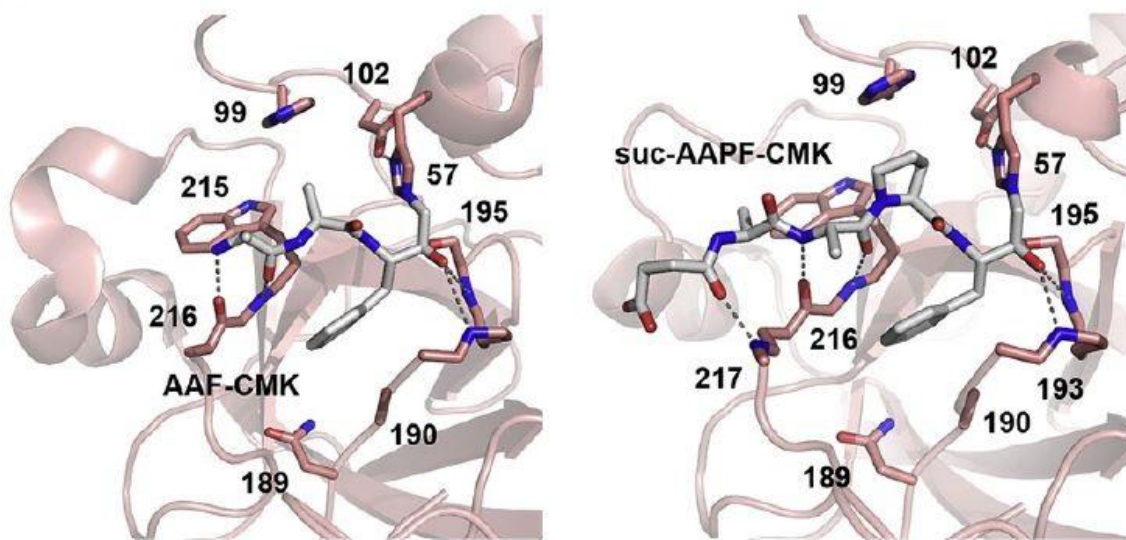


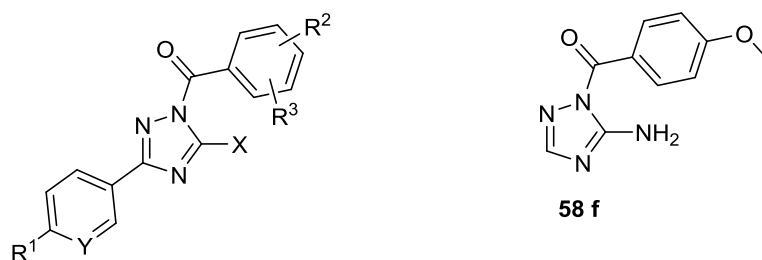
Abbildung 30: Bindungsmodus der irreversiblen Inhibitoren H-Ala-Ala-Phe-CMK (**57**) (links) und Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-CMK (**55**) (rechts) im aktiven Zentrum des KLK7. Grafik entnommen aus^[145].

Die P1'-Methylen-Gruppe ist kovalent an das N ϵ von His57 gebunden, darüber hinaus existiert eine Hemiketalbindung zwischen dem P1-Carbonyl-C und dem O γ des Ser195, wobei der Carbonyl-Sauerstoff des Inhibitors das Oxyanion-Loch besetzt. Die Seitenkette des P1-Phe befindet sich in der Spezifitätstasche, jedoch gibt es keine spezifische Interaktion zum Asn189 am Boden der S1-Tasche^[91]. Das P2-Ala des Inhibitors H-Ala-Ala-Phe-CMK ist nicht in der Lage, die S2-Tasche des KLK7 auszufüllen, und das P3-Ala ist in Richtung des Lösemittels orientiert und bildet Wasserstoffbrücken zwischen seinem Carbonyl-Kohlenstoff und Amidstickstoff zu Gly216 aus. Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-CMK (**55**) bildet dieselben kovalenten Bindungen zu His57 und Ser195 aus, die bereits zuvor für den anderen CMK-Inhibitor beschrieben wurden. Ebenso bindet das P1-Phe in identischer Weise an KLK7. Das P2-Pro besetzt die P2-Tasche und das P3-Ala interagiert mit Gly 216. Der P4-Ala-Rest sitzt in der von Trp215, His99 und Leu 175 gebildeten S3/4-Tasche, ist jedoch nicht in der Lage, diese vollständig auszufüllen.

Tan et al.^[160] untersuchten eine Reihe von Derivaten des 1,2,4-Triazols auf ihre Hemmwirkungen gegenüber den KLKs 5, 7 und 14 sowie mit Matriptase (Tabelle 9). Die Moleküle besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal eine aktivierte Amidfunktion, bedingt durch den pseudoaromatischen Charakter des Triazolringes, der über einen seiner Stickstoffe mit einer Carbonylgruppe verbunden ist.

Von Molekülen dieses Typs war bekannt, dass sie KLK5 hemmen. Die selektivste Hemmwirkung (Tabelle 9) gegenüber KLK7 wurde durch Verbindung **58c** erzielt, deren IC₅₀-Wert bei 40 nM liegt, wobei die Werte für KLK5, KLK14 und Matriptase um den Faktor 6, 28 bzw. 12 schwächer sind. Die Verbindung **58b** wirkt sogar ausschließlich auf KLK7, jedoch war der IC₅₀-Wert dieser Verbindung im Vergleich zu Inhibitor **58c** ca. 90-fach reduziert. Die Reversibilität der Hemmung wurde durch Behandlung mittels Hydroxylamin bestätigt, was zur spontanen Reaktivierung der gehemmten Enzyme führte. Als Hemmmechanismus wird vermutet, dass das Ser195 des aktiven Zentrums mit seiner OH-Gruppe die aktivierte Carbonylfunktion des Inhibitors nukleophil angreift, was zur Bildung eines Acyl-Enzyms führt. Dieses Intermediat ist durch das nukleophile Hydroxylamin wieder spaltbar. Die reversible Hemmung durch Bildung eines Acyl-Enzym steht im Einklang mit den mittels Docking gefundenen Komplexstrukturen^[160].

Tabelle 9: IC₅₀-Werte für die Hemmwirkung ausgewählter Triazol-Derivate auf KLK7^[160].

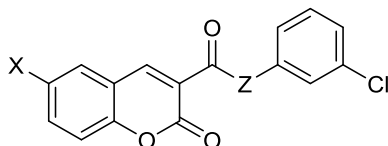


- 58 a)** Y = N, R¹ = H, X = NH₂, R² = H, R³ = 4'-Cl
58 b) Y = N, R¹ = H, X = NH₂, R² = 2'-Cl, R³ = 4'-Cl
58 c) Y = N, R¹ = H, X = NH₂, R² = H, R³ = 4'-CH₃
58 d) Y = C, R¹ = H, X = NH₂, R² = 3'-OCH₃, R³ = 4'-OCH₃
58 e) Y = C, R¹ = H, X = S-CH₃, R² = R³ = H

Nr.	IC ₅₀ (μM)			
	KLK5	KLK7	KLK14	Matriptase
58a	1,14	0,22	> 30	> 30
58b	>30	3,5	-	-
58c	0,27	0,04	1,29	0,57
58d	1,3	0,23	>30	>30
58e	0,14	0,66	0,97	0,42
58f	0,99	0,61	3,43	>30

Tan et al veröffentlichten 2015^[84] eine Untersuchung zur Hemmung des KLK7 durch eine Reihe von Coumarin-Derivaten (Tabelle 10).

Tabelle 10: Hemmung des KLK7 und verwandter Proteasen durch Coumarinester-Derivate^[84] (k. H., keine Hemmung).



IC ₅₀ -Werte(μM) oder % Hemmung bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μM						
Nr.	Z	X	KLK5	KLK7	KLK14	Matriptase
59a	O	-CH ₂ Cl	k. H. ^a	0,103	kH ^a	k. H. ^a
59b	O	-CH ₂ Br	0,92	0,064	2,9	1,42
59c	O	-CH ₂ OCOCH ₃	31 %	56 %	31 %	k. H. ^a
59d	NH	-CH ₂ Cl	k. H. ^a	60 %	k. H. ^a	k. H. ^a
59e	S	-CH ₂ Cl	k. H. ^a	0,35	34 %	k. H. ^a

^a < 30 % Hemmung bei 50 μM, k. H. = keine Hemmung

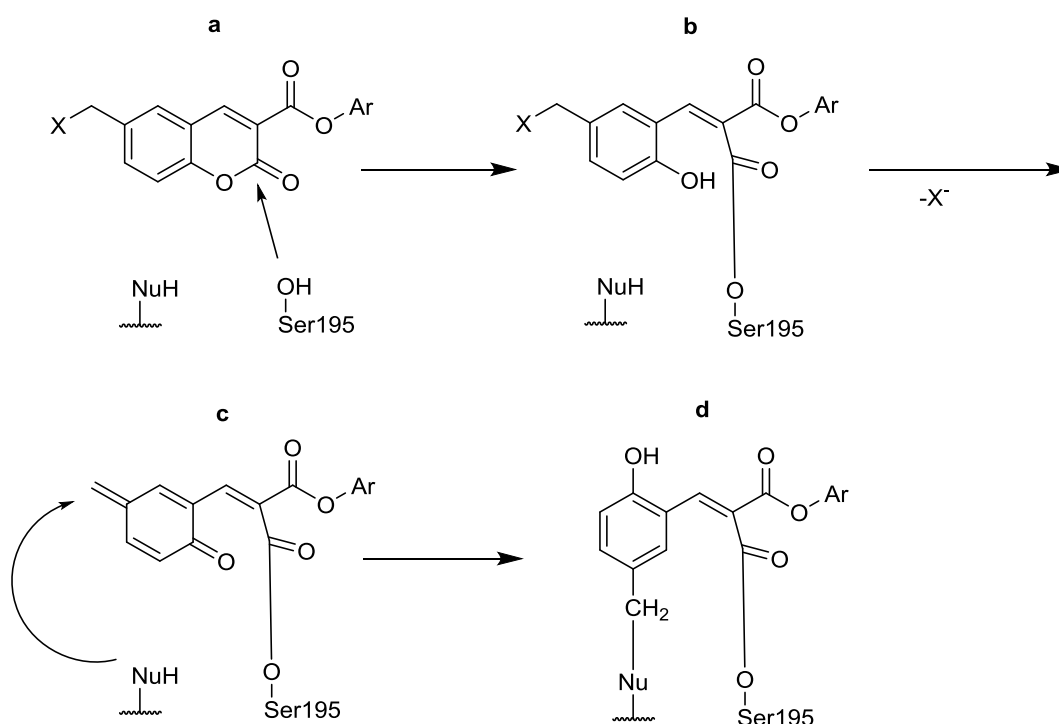


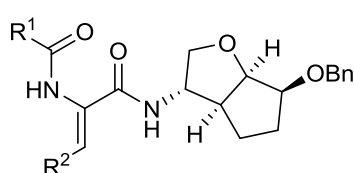
Abbildung 31: Hemmmechanismus acylierender Coumarin-Inhibitoren^[84].

Abbildung 31 zeigt schematisch die Wirkweise der initial kovalent acylierenden Coumarininhibitoren. Zunächst (Abbildung 31a) kommt es zu einem nukleophilen Angriff der OH-Gruppe des Ser195 auf die Carbonylfunktion des Inhibitors und zur Ausbildung einer

kovalenten Bindung unter Ringöffnung des Lactons (Abbildung 31b). Nach Abspaltung der Abgangsgruppe X kommt es zu einem nukleophilen Angriff durch ein Stickstoffatom des His57 (Abbildung 31c). Während das in Abbildung 31b gezeigte Acyl-Enzym einen reversiblen Zustand darstellt, ist das Enzym in Abbildung 31d aufgrund der Alkylierung des His57 irreversibel gehemmt.

Freitas et al.^[161] untersuchten eine Reihe von Isomannid-Derivaten (Tabelle 11) auf ihre Hemmwirkung gegenüber KLK7. Die Isomannid-Struktur wurde wegen ihrer Vergleichbarkeit mit rigiden zyklischen Dipeptiden ausgewählt. Die Steifheit des Grundgerüsts stellt hierbei eine Möglichkeit dar, den Inhibitor in einer aktiven Konformation zu fixieren.

Tabelle 11: IC₅₀- und K_i-Werte der KLK7-Hemmung durch ausgewählte Isomannid-Derivate^[161].



Nr.	R ¹	R ²	KLK7		KLK5	
			IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
60a	Ph	2-Thiophen	13,3	1,8	99,2	70,7
60b	Ph	3,4- (OCH ₂ O)C ₆ H ₃	205,2	80,3	>1000	357,1
60c	Ph	3-Pyridyl	195,8	75,1	323,5	200
60d	Ph	2-Furan	16,3	3,0	99,1	70,4
60e	Me	2-Thiophen	160,5	77,4	101,3	71,9

Die stärkste Hemmwirkung wurde für das Derivat **60a** gefunden. Basierend hierauf wurden weitere^[162] Isomannid-basierte Peptidomimetika als Hemmstoffe gegen KLK7 wie Verbindung **61** (Abbildung 32) untersucht, deren Bindungsmodus im Komplex mit KLK7 modelliert wurde (Abbildung 33)^[162].

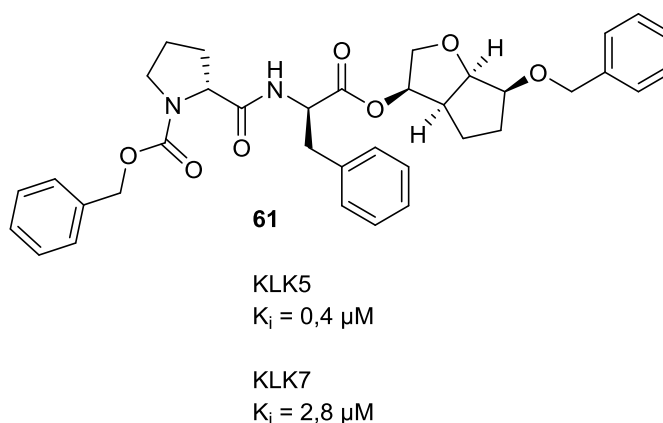


Abbildung 32: Beispiel eines Isomannid-basierten Peptidomimetikums.

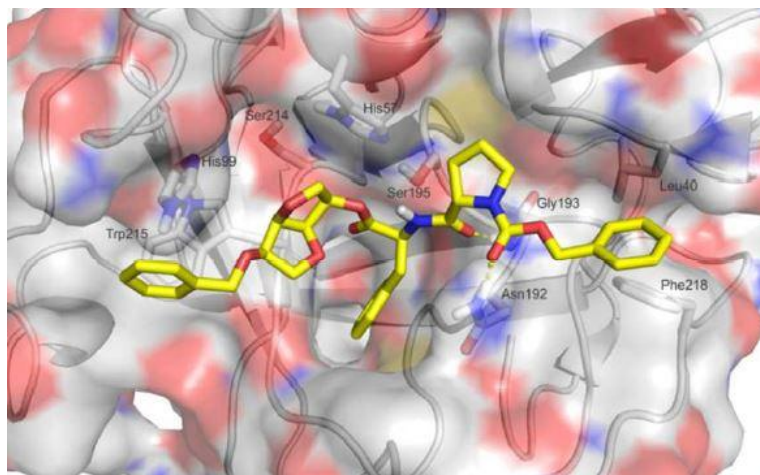
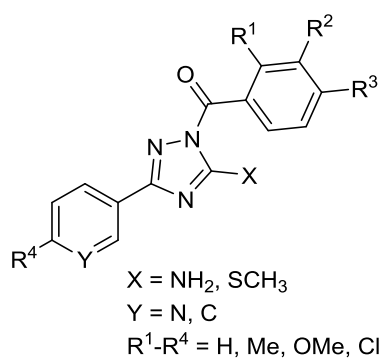
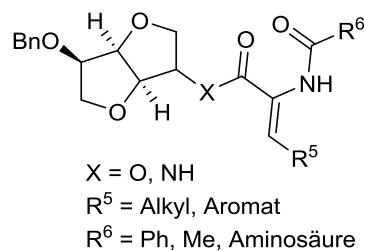


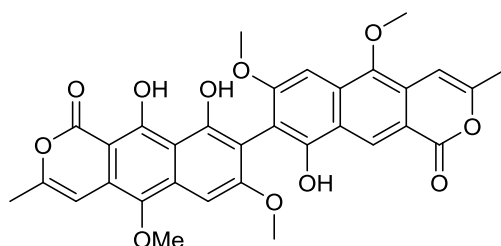
Abbildung 33: Modellierter Komplex des Inhibitors **61** im aktiven Zentrum des KLK7. Der P4-Benzylrest besetzt die S4-Tasche des Enzyms oberhalb des Trp215. Die Isomannid-Gruppe, welche die Rolle des P3-P2-Segments einnimmt, orientiert sich in Richtung der S2-Tasche und der P1-Phenylalanin-Rest belegt die S1-Tasche, dringt jedoch nicht tief ein. Grafik entnommen aus^[162].



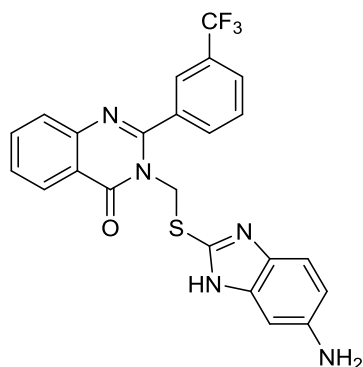
Acyl-1,2,4-Triazole
 $0,04 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} < 0,66 \mu\text{M}$



Isomannid-Derivative
 $12,2 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} < 205,2 \mu\text{M}$



8,8'-Paepalantin
 $\text{IC}_{50} = 112,4 \mu\text{M}$



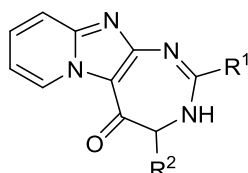
$\text{IC}_{50} = 25,1 \mu\text{M}$

Abbildung 34: Beispiele für heterocyclische Inhibitoren des KLK7. Grafik basierend auf^[163].

Basierend auf den bereits bekannten heterozyklischen Hemmstoffen des KLK7 (Abbildung 34) untersuchten Arama et al.^[163] eine Reihe weiterer Substanzen auf ihre Hemmwirkung gegenüber KLK7. Diese wurden bei einer Konzentration von jeweils $50 \mu\text{M}$ vermessen und die Reversibilität der Hemmung durch Verdünnung des Messansatzes geprüft. Bei reversibel

hemmenden Inhibitoren trat hierbei eine spontane Reaktivierung der enzymatischen Aktivität auf. Die Verbindung **62a** stellte sich als relativ selektiver Hemmstoff des KLK7 heraus und zeigte bei der geprüften Konzentration keine Beeinflussung des KLK5, 8 und 14 und diente daher als Ausgangspunkt für die Synthese weiterer Hemmstoffe (Tabelle 12).

Tabelle 12: Hemmwirkung von Pyrido-Imidodiazepinonen gegen KLK7^[127].



Nr.	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)
62a	2-Me-C ₆ H ₄	(S)-Bn	57,0
62b	3-Me-C ₆ H ₄	(S)-Bn	k. H. ^a
62c	4-Me-C ₆ H ₄	(S)-Bn	68,0
62d	4-MeO-C ₆ H ₄	(S)-Bn	72,0
62e	2-Me-C ₆ H ₄	(R)-Bn	95,9
62f	C ₆ H ₅	(S)-Bn	kH ^a
62g	4-Br-C ₆ H ₄	(S)-Bn	kH ^a
62h	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	(S)-Bn	kH ^a
62i	3-Pyridinyl	(S)-Bn	kH ^a
62j	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	(S)-Bn	kH ^a
62k	2,4-diMe-C ₆ H ₃	(S)-Bn	83,9
62l	2-MeO-C ₆ H ₄	(S)-Bn	kH ^a
62m	3-MeO-C ₆ H ₄	(S)-Bn	kH ^a
62n	2,5-diMeO-C ₆ H ₃	(S)-Bn	80,9
62o	3,4-diMeO-C ₆ H ₃	(S)-Bn	33,5
62p	3,4,5-triMeO-C ₆ H ₃	(S)-Bn	55,7
62q	4-HO-C ₆ H ₄	(S)-Bn	124,8

^a < 30 % Hemmung bei 50 μM, k. H. = keine Hemmung

Als wirksamster Hemmstoff erwies sich das Derivat **62o** mit einem IC₅₀-Wert von 33,5 μM (K_i bei 27 μM). Bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μM wurde keine Hemmwirkung gegen die KLKs 5, 8 und 14 beobachtet.

Von der Firma Novartis wurde 2008 ein Patent^[164] zu Hemmstoffen des KLK7 veröffentlicht. Nachfolgend sind einige Beispiele der beanspruchten Strukturen aufgeführt.

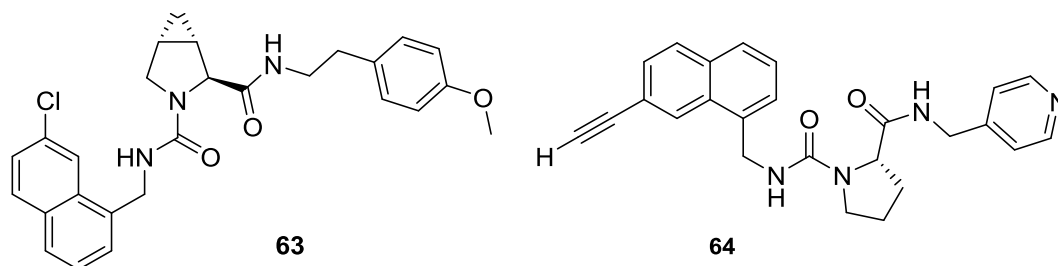


Abbildung 35: Strukturen der Hemmstoffe 63 und 64 aus einer Patentanmeldung der Firma Novartis^[164].

Die Verbindung **63** wurde im Mausmodell untersucht und es wurde gezeigt, dass deren Applikation (als Emulsion) die Barrierefunktion der Haut durch Hemmung des KLK7 verbessert. Der Hemmstoff **64** wurde am Schwein zur Reduktion von Hautrötungen (Erythema) bei allergischen Reaktionen geprüft. Im Vergleich zur Kontrolle wurde eine deutliche Verringerung der Rötung festgestellt.

Der zu den Verbindungen aus dem Patent^[164] vergleichbare Hemmstoff **56** (KLK7 IC_{50} = 0,7 μ M) wurde 2016 in KLK7 kristallisiert^[95], der bestimmte Bindemodus ist in Abbildung 36 dargestellt.

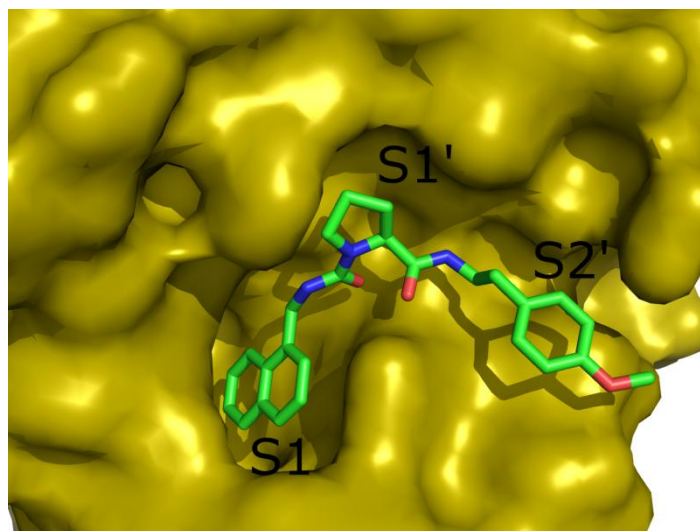


Abbildung 36: Komplex des Inhibitors 56 (Kohlenstoffe grün, Stickstoff blau, Sauerstoff rot) im aktiven Zentrum des KLK7 (dargestellt mit olivfarbener Oberfläche, PDB: 5FAH). Die S1-Tasche des Enzyms wird vom Naphthyl-Rest des Inhibitors **56** besetzt, der gekoppelte Prolin-Rest und die Methoxyphenethylgruppe binden in die Taschen S1' und S2'^[95].

Es kann angenommen werden, dass die anderen im Novartis-Patent^[164] gezeigten Verbindungen einen vergleichbaren Bindemodus aufweisen.

2009 wurde von der Firma Novartis ein weiteres Patent^[165] veröffentlicht, in dem zahlreiche Depsipeptide als KLK7 Hemmstoffe beschrieben wurden, die Hemmkonstanten im Bereich von 1 nM bis 10 μ M besitzen. Ein Beispiel für diese Verbindungsklasse ist der in Abbildung 37 gezeigte Inhibitor **65**.

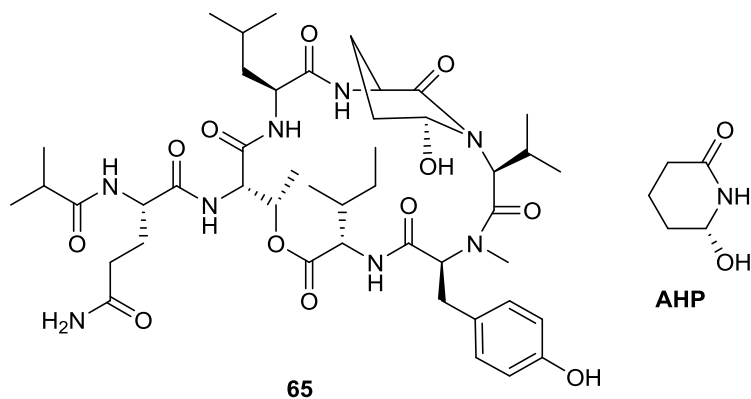


Abbildung 37: Depsipeptid **65**, veröffentlicht in^[165].

Bei dem in Abbildung 37 gezeigten Depsipeptid ist der Ring durch einen intramolekularen Threoninester geschlossen. Im Macrozyklus ist AHP enthalten.

2 Ziel der Arbeit

Matriptase und KLK7 sind an einer Reihe von pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Zu hohe Aktivitäten dieser Enzyme können verschiedene Erkrankungen auslösen oder verstärken, daher ist die Entwicklung wirksamer und selektiver Hemmstoffe dieser Enzyme von potentiell therapeutischem Interesse.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit können in zwei Gebiete eingeteilt werden.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Adressierung der Matriptase.

- Dabei sollten die von Hammami dargestellten substratanalogen Matriptaseinhibitoren des allgemeinen Typs H-D-hPhe-P2-4-Amba optimiert werden. Da aus Arbeiten mit anderen Inhibitortypen bekannt war, dass chloresubstituierte Phenylgruppen bevorzugt in die S3/4-Tasche der Matriptase binden, sollte das D-hPhe durch kommerziell erhältliche oder selbst synthetisierte Derivate oder strukturell verwandte Substanzen ersetzt werden, um eine verbesserte Hemmwirkung zu erreichen.
- Parallel dazu sollten fluorogene Substrate der Matriptase identifiziert bzw. neu synthetisiert werden, um die enzymkinetischen Messungen im Vergleich zu den früher genutzten chromogenen Substraten mit reduzierten Enzym- und Substratkonzentrationen durchführen zu können.
- Ausgehend von einer Kristallstruktur dieses Inhibitortyps in Trypsin sollte der Bindungsmodus in Matriptase modelliert werden.
- Zusätzlich sollten Messungen mit den verwandten trypsinartigen Serinproteasen Thrombin und Faktor Xa durchgeführt werden, um erste Hinweise zur Selektivität der Verbindungen zu erhalten, um diese gegebenenfalls verbessern zu können.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Adressierung des KLK7.

- Zu Beginn sollte ein geeignetes fluorogenes Substrat für enzymkinetische Messungen mit KLK7 entwickelt und ein geeignetes Testsystem aufgebaut werden.
- Anschließend sollte ein Screening der im Arbeitskreis vorhandenen Substanzen durchgeführt werden, um potentielle Startstrukturen für KLK7-Hemmstoffe zu finden.
- Basierend auf den Ergebnissen des Screenings sollten neue substratanaloge Hemmstoffe des KLK7 hergestellt und charakterisiert werden. Dabei sollten die P1 bis P4-Positionen der Hemmstoffe optimiert und am Ende die günstigsten Reste miteinander kombiniert werden.
- Zusätzlich sollte das Selektivitätsprofil der KLK-7 Hemmstoffe im Vergleich zu den verwandten Serinproteasen Trypsin und Faktor Xa geprüft und verbessert werden.
- Da bisher keine Kristallstrukturen mit den neu entwickelten KLK7-Hemmstoffen verfügbar waren, sollte der Bindungsmodus der wirksamsten Inhibitoren im Komplex mit KLK7 modelliert werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Matriptase

3.1.1 Substrate der Matriptase

Die bisherigen Messungen mit Matriptase wurden im Arbeitskreis mit dem chromogenen Substrat Mes-D-Cha-Gly-Arg-pNA durchgeführt. Die Verwendung chromogener Substrate erfordert in der Regel deutlich höhere Enzymkonzentrationen. Um die Messungen auf fluorogene Substrate umzustellen, wurde zu Beginn eine Reihe von im Arbeitskreis bereits verfügbaren peptidischen AMC-Derivaten mit Arginin in P1-Position auf ihre Eignung als Matriptasesubstrate untersucht. Die Messungen erfolgten wie im experimentellen Teil (Tabelle 29) beschrieben, die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Screening verfügbarer fluorogener Substrate trypsinartiger Serinproteasen mit Matriptase.

Substrat	Sequenz	K_M (μM)	V_{\max} ($\mu\text{M/s}$)	V_{\max}/K_M (1/s)
66	Z-D-Arg-Pro-Arg-AMC	$17,1 \pm 1,5$	$1,0 \times 10^{-3} \pm 6,7 \times 10^{-5}$	$5,9 \times 10^{-5}$
67	Z-D-Arg-Gly-Arg-AMC	$17,3 \pm 3,2$	$1,1 \times 10^{-3} \pm 5,4 \times 10^{-5}$	$6,2 \times 10^{-5}$
68	Bzls-D-Arg-Pro-Arg-AMC	$11,4 \pm 1,3$	$1,9 \times 10^{-3} \pm 9,5 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-4}$
69	Bzls-D-Arg-Gly-Arg-AMC	$12,0 \pm 1,3$	$1,5 \times 10^{-3} \pm 1,3 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$
70	H-D-Arg-Pro-Arg-AMC	$20,0 \pm 0$	$7,6 \times 10^{-4} \pm 1,3 \times 10^{-5}$	$3,8 \times 10^{-5}$
71	H-D-Arg-Gly-Arg-AMC	$20,0 \pm 0$	$7,2 \times 10^{-4} \pm 2,7 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-5}$
72	Mes-D-Arg-Pro-Arg-AMC	$9,1 \pm 0,2$	$2,0 \times 10^{-3} \pm 1,1 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-4}$
73	Mes-D-Arg-Gly-Arg-AMC	$11,4 \pm 2,3$	$2,4 \times 10^{-3} \pm 8,1 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-4}$
74	Mes-D-Arg-Ala-Arg-AMC	$7,1 \pm 0,9$	$8,2 \times 10^{-4} \pm 3,4 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$

Die getesteten Substanzen zeigten relativ ähnliche Werte für K_M und V_{\max} . Als geeignetstes Matriptasesubstrat erwies sich die Verbindung **72**, die daher im Folgenden für die enzymkinetischen Messungen mit Matriptase genutzt wurde. Das dibasische Substrat **72** ist in sämtlichen wässrigen Systemen sehr gut löslich, daher kann auf den Zusatz organischer Lösungsmittel bei der Herstellung von Substratstammlösungen verzichtet werden.

Da bei einigen Matriptase-Inhibitoren (vgl. **49** $K_i = 0,044 \mu\text{M}$ vs. **48** $K_i = 0,06 \mu\text{M}$) eine leichte Verbesserung der Affinität zur Matriptase durch den Austausch von Prolin als P2-Rest durch Alanin erreicht wurde, wurde zusätzlich die Verbindung **74** hergestellt, die das Ala-Analogon des Substrats **72** ist. Eine Verbesserung der kinetischen Parameter konnte hierdurch nicht erreicht werden.

3.1.2 Entwicklung neuer substratanaloger Matriptaseinhibitoren

Wie in Tabelle 3 in Kapitel 1.1.6 beschrieben, wurden bereits in vergangenen Arbeiten in der Arbeitsgruppe Steinmetzer mehrere substratanaloge Hemmstoffe mit einem C-terminalen 4-Amidinobenzylamid-Rest (4-Amba) auf ihre Hemmwirkung gegenüber Matriptase untersucht. Ein relativ wirksamer Inhibitor ist die in Abbildung 38 gezeigte Verbindung Benzylsulfonyl-D-Arg-Pro-4-Amba (Hemmstoff **31** in Tabelle 3).

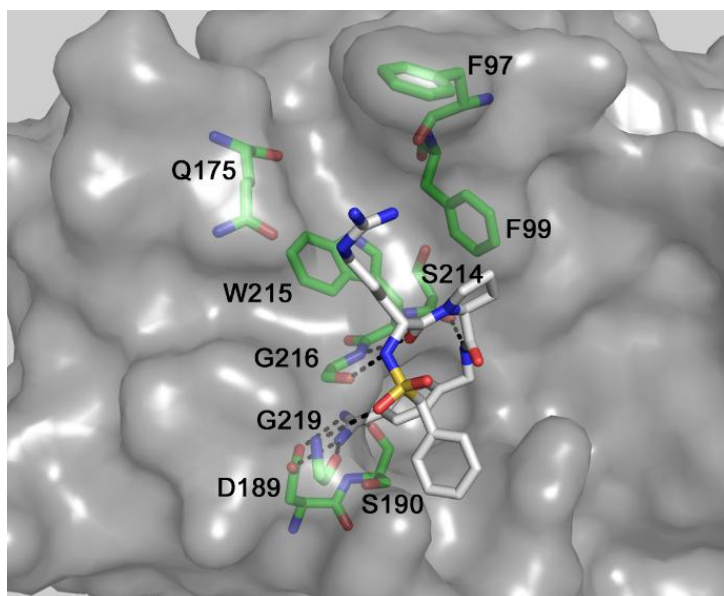


Abbildung 38: Modellierter Komplex des Inhibitors **31** (Kohlenstoffatome in weiß, Stickstoff blau, Sauerstoff rot) im aktiven Zentrum der Matriptase, dargestellt mit transparenter Oberfläche in hellgrau. Die Koordinaten der Matriptase wurden von der Kristallstruktur mit dem PDB-Code 2GV6 entnommen. Die S3/4-Tasche wird von den Resten Phe97, Phe99, Gln175 und Trp215 gebildet. Die polaren Wechselwirkungen der Verbindung **31** mit der Matriptase sind als gestrichelte schwarze Linien dargestellt, die Kohlenstoffatome ausgewählter Matriptasereste sind in grün gezeichnet (Grafik entnommen aus^[166]).

Da nur eine begrenzte Menge an Matriptase zur Verfügung steht, war es bisher nicht möglich, das Enzym im Komplex mit substratanalogen Inhibitoren dieses Typs zu kristallisieren. Zur Bestimmung des Bindemodus wurde daher eine Kristallstruktur von Bzls-D-Arg-Gly-4-Amba, dem Gly-Analogen des Inhibitors **31**, in einer Trypsin-Mutante (PDB: 3PMJ) benutzt^[167]. Der Komplex wurde durch einen C- α -Fit mit der Matriptase-Struktur 2GV6^[13] überlagert, hierbei wurden alle Wassermoleküle entfernt. Das P2-Gly wurde mittels MOE (Version 2014.9, 32 bit, Chemical Computing Group, Montreal, Kanada) durch ein Pro ersetzt, alle anderen Reste wurden fixiert. Die erhaltene Struktur des Komplexes (Abbildung 38) zeigten den erwarteten Bindemodus, der von einer Vielzahl von Strukturen substratanaloger Hemmstoffe mit D-konfigurierten P3-Resten in trypsinartigen Serinproteasen bekannt ist. Die Seitenkette des D-Arg ist in die S3/4-Tasche orientiert und es könnten Kation- π -Interaktionen mit Trp215 auftreten. Die Guanidino-Gruppe der Seitenkette bildet jedoch keine direkten Wasserstoffbrückenbindungen zur Matriptase aus. Wie erwartet, bindet die Benzamidingruppe an Asp189 am Boden der S1-Tasche. Darüber hinaus treten Wechselwirkungen zwischen den Resten Ser214, Gly216 und Gly219 mit dem Peptidrückgrat des Inhibitors auf. Aufgrund dieses Modells wurde vermutet, dass die

Affinität des Hemmstoffs **31** durch Ersatz des P3 D-Arg und/oder des P2-Pro durch andere Reste erhöht werden kann. Ebenso wurde angenommen, dass trotz dieser Austausche die Gesamtkonformation des Inhibitors im Komplex mit Matriptase und die daraus resultierenden Wechselwirkungen des Inhibitorrückgrats mit der Protease erhalten bleiben.

In Untersuchungen von Hammami (Tabelle 5) wurde eine wirksame Hemmung der Matriptase durch die substratanalogen Verbindungen **49** und **50** (Abbildung 39) gezeigt.

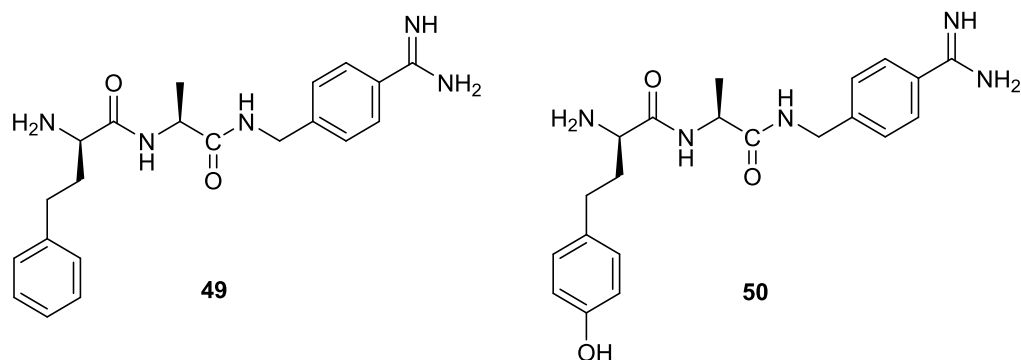


Abbildung 39: Verbindungen **49**, K_i (Matriptase) = 44 nM und **50**, K_i (Matriptase) = 26 nM^[83].

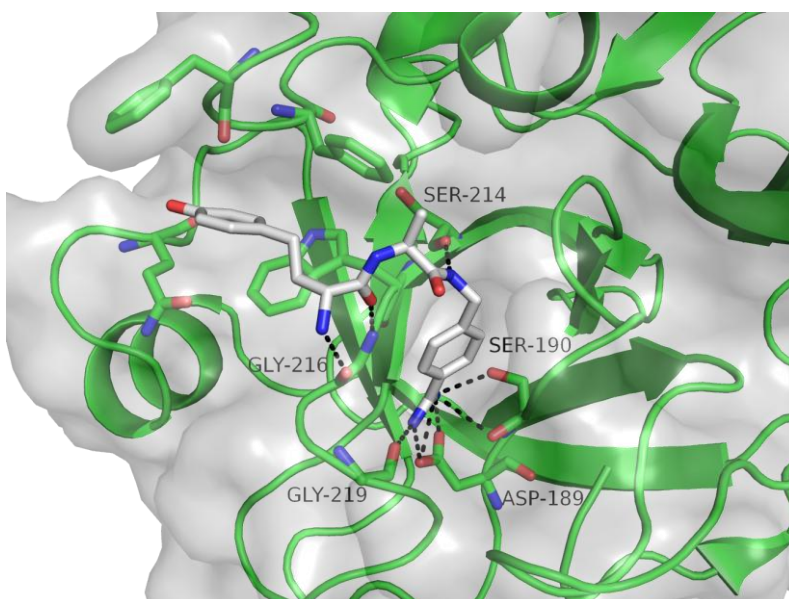


Abbildung 40: Modellierter Komplex des Inhibitors **50** (Kohlenstoffe in grau, Stickstoff blau, Sauerstoff rot) in Matriptase (2GV6). Es wurden zunächst die Kristallstrukturen 4MTB (Inhibitor **50** in Trypsin) und 2GV6 (Koordinaten der Matriptase) mittels PyMOL v0.98 (DeLano Scientific, San Carlos, CA) überlagert, anschließend Trypsin gelöscht und eine Energieminimierung der D-hTyr-Seitenkette in P3-Position des Inhibitors **50** mittels MOE (Version 2014.9, Chemical Computing Group, Montreal, Kanada) durchgeführt. Die Grafik wurde mittels PyMOL erstellt. Bei der Minimierung der Seitenkette waren alle anderen Reste fixiert. Die gefundenen polaren Wechselwirkungen sind als gestrichelte Linien dargestellt^[166].

Zur Prüfung des Bindungsmodus des Inhibitors **50** im aktiven Zentrum der Matriptase wurde der in Abbildung 40 dargestellte Komplex modelliert. Es ist zu erkennen, dass die P3-D-hTyr-Seitenkette in die S3/4-Tasche gerichtet ist, die von den Resten Trp215 und Phe99, Gln175 und Phe97 gebildet wird. Die erwarteten Wechselwirkungen in der S1-Tasche und

ausgehend vom Rückgrat des Inhibitors mit den Matriptaseresten Ser214 und Gly216 sind unverändert, wie bereits zuvor für Inhibitor **31** beschrieben (Abbildung 38).

Aufgrund der starken Hemmwirkung der Verbindung **50** wurde eine Reihe von substituierten D-Homophenylalanin-Derivaten (Abbildung 41) in P3-Position eingebaut. Bei der Wahl der Derivate wurde berücksichtigt, dass sich in vorangegangenen Untersuchungen mit Derivaten des 3-Amidinophenylalanins^[76] eine Chlor- oder Methoxysubstitution des N-terminalen Biphenylrestes (Tabelle 1) als vorteilhaft erwiesen hatte. Daher wurden die in Abbildung 41 dargestellten ungewöhnlichen Aminosäuren hergestellt.

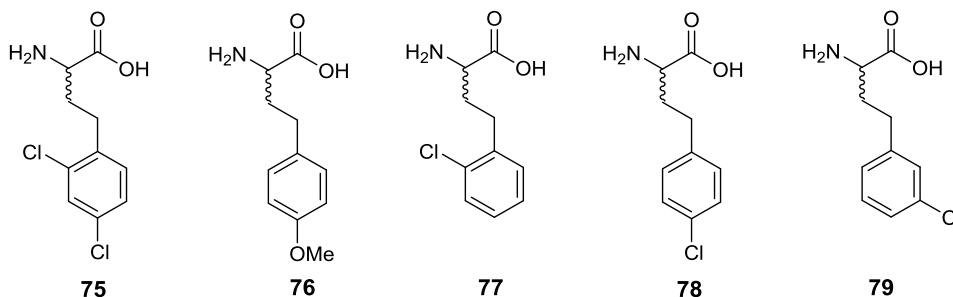


Abbildung 41: Hergestellte Homophenylalaninderivate.

Zur Synthese dieser D-Homophenylderivate wurden entsprechend substituierte Phenethylbromide oder -chloride in Anwesenheit von Kaliumiodid und Kaliumcarbonat mit Ethyl-2-acetamido-cyanoacetat umgesetzt. Nach saurer Hydrolyse wurden die racemischen ungewöhnlichen Aminosäurederivate erhalten^[168]. Mit diesen Verbindungen wurden verschiedene substratanaloge Hemmstoffe mit einem C-terminalen 4-Amidinobenzylamid-Rest hergestellt (Abbildung 42).

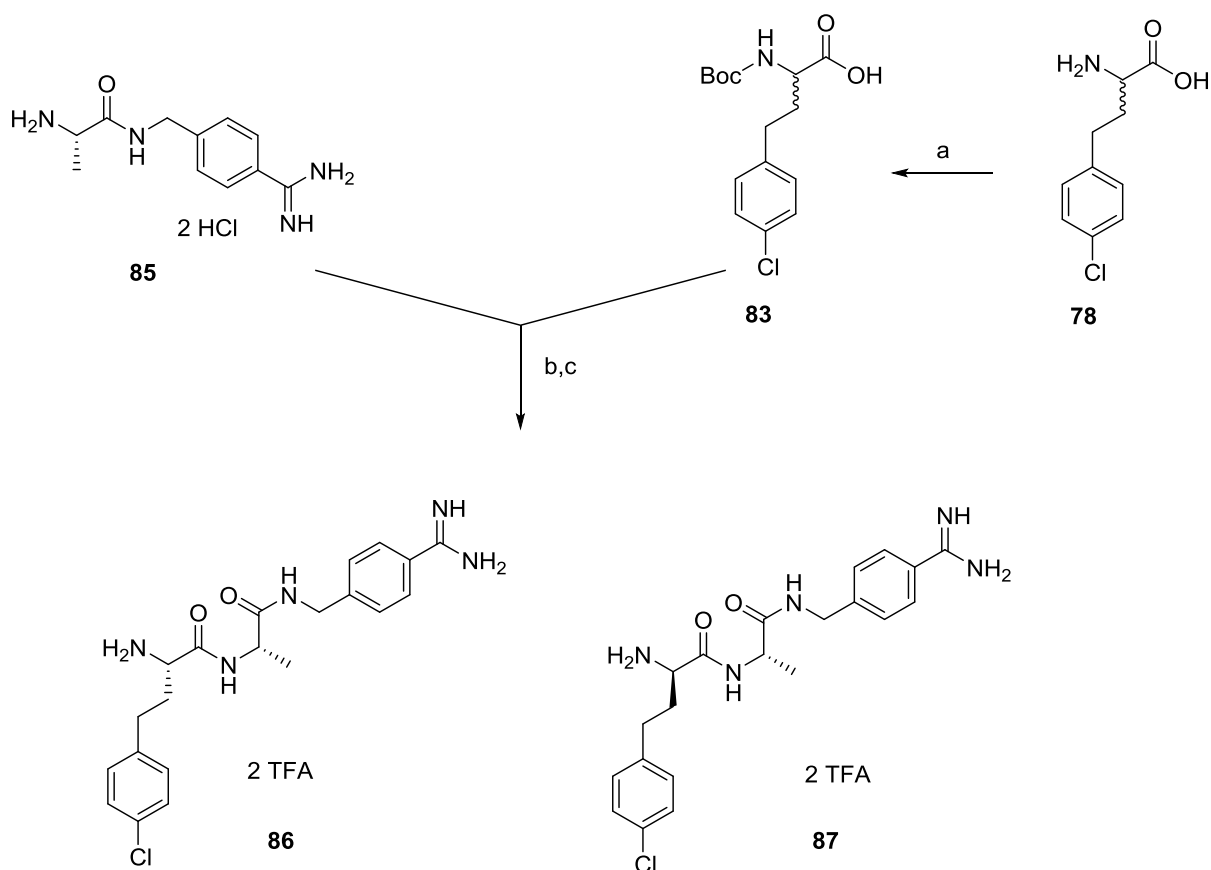
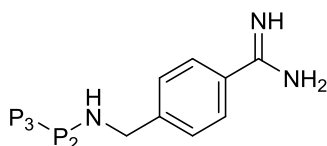


Abbildung 42: Synthese der racemischen substratanalogen Inhibitoren. Reaktionsbedingungen und Reagenzien: (a) 1.2 Äquiv. Boc_2O in Dioxan und Wasser, pH zirka 8,5, eingestellt mit 1 N NaOH. (b) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (c) TFA, 1 h, RT, präparative HPLC.

Die Synthese der substratanalogen Inhibitoren ist am Beispiel der Verbindungen **86** und **87** in Abbildung 42 dargestellt. Racemisches H-D/L-hPhe(4-Cl)-OH (**78**) wurde mittels Boc_2O an seiner Aminofunktion geschützt. Das dabei erhaltene Boc-D/L-hPhe(4-Cl)-OH (**83**) wurde mit 1 Äquiv. H-Ala-4-Amba \times 2 HCl (**85**) unter Verwendung von 1 Äquiv. BOP und 2 Äquiv. DIPEA in DMF gekuppelt. Nach Entfernung des Lösemittels wurde die Schutzgruppe durch Behandlung mit TFA abgespalten und die diastereomeren Verbindungen **86** und **87** mittels präparativer HPLC getrennt. Sämtliche anderen substratanalogen Hemmstoffe (Tabelle 14) mit D-Homophenylalanin-Derivaten in P3-Position wurden analog dargestellt. Für die Inhibitoren mit Pro in P2-Position wurde H-Pro-(4-Amba \times 2 HCl (**88**) an Stelle des Ala-Intermediats **85** (Abbildung 42) eingesetzt.

Die dargestellten Hemmstoffe wurden auf ihre Hemmwirkung gegenüber Matriptase, Thrombin und FXa untersucht. Die Durchführung der Messungen ist in Kapitel 5.2 beschrieben.

Tabelle 14: Inhibierung von Matriptase, Thrombin und FXa durch substratanaloge Hemmstoffe mit substituierten D-Homophenylalanin-Derivaten in P3-Position.



Nr.	P3	P2	K _i (μM)		
			Matriptase	Thrombin	FXa
87	D-hPhe(4-Cl)	Ala	0,046	0,007	2,3
89	D -hPhe(2-Cl)	Ala	0,11	0,08	0,19
90	D -hPhe(4-Cl)	Pro	0,11	0,014	1,32
91	D -hPhe(2-Cl)	Pro	0,14	0,013	0,45
92	D -hPhe(2,4-Cl ₂)	Ala	0,15	0,15	0,25
93	D -hPhe(3-Cl)	Ala	0,16	0,07	1,33
94	D -hPhe(2,4-Cl ₂)	Pro	0,19	0,15	0,74
95	D -hPhe(4-MeO)	Ala	0,28	0,18	6,87
96	D -hPhe(4-MeO)	Pro	0,37	0,012	1,87
97	D -hPhe(3-Cl)	Pro	0,46	0,032	1,21
86	hPhe(4-Cl)	Ala	3,02	0,57	33,9
98	hPhe(2,4-Cl ₂)	Ala	3,94	0,57	12,5
99	hPhe(4-MeO)	Ala	4,17	4,26	46,71
100	hPhe(3-Cl)	Pro	5,28	0,65	1,04
101	hPhe(2-Cl)	Ala	6,32	2,12	10,58
102	hPhe(4-MeO)	Pro	7,69	0,74	89,4
103	hPhe(3-Cl)	Ala	9,97	2,69	10,44
104	hPhe(2,4-Cl ₂)	Pro	11,6	1,13	31,6
105	hPhe(2-Cl)	Pro	12	1,21	24,8
106	hPhe(4-Cl)	Pro	15	0,37	39,2

Von substratanalogen Hemmstoffen ist bekannt, dass D-konfigurierte Aminosäuren in Position P3 bevorzugt sind. Nach Bestimmung der Hemmkonstanten gegenüber Matriptase wurde daher der jeweils wirksamere Inhibitor eines Diastereomerenpaares als D-konfiguriert betrachtet. Keine der in

Tabelle 14 gezeigten Verbindungen erreichte eine vergleichbare Hemmstärke wie zuvor für Inhibitor **50** beschrieben^[83].

Inhibitor **87**, der von den in Tabelle 14 gezeigten Verbindungen die stärkste Hemmwirkung gegenüber Matriptase aufweist, ist etwa um den Faktor 2 schwächer als der Hemmstoff **50**. Die Hemmwirkung gegenüber Thrombin ist bei dem Inhibitor **87** um den Faktor 40 stärker als bei Verbindung **50**, jene gegenüber FXa um den Faktor 4 schwächer. Zum aktuellen Zeitpunkt ist die Verbindung **50** somit der beste und selektivste substratanaloge Inhibitor der Matriptase, der innerhalb unserer Arbeitsgruppe hergestellt wurde.

Bei Inhibitoren des 3-Amidinophenylalanin-Typs^[76] hatte sich gezeigt (Tabelle 1), dass eine Chlorsubstitution des terminalen Aromaten an der Biphenyl-3-Sulfonyl-Gruppe zu einer deutlichen Verbesserung der Hemmwirkung führte (Tabelle 1). Verbindung **27** besitzt eine etwa 50-fach stärkere Wirksamkeit im Vergleich zum unsubstituierten Analogon **22**. Eine solche Verbesserung der Hemmwirkung durch Chlorsubstitution in para-Stellung des P3-Aromaten wurde für die untersuchten substratanalogen Hemmstoffe (Tabelle 14) ebenfalls erwartet. Die entsprechenden Analoga, ebenso wie die methoxysubstituierten Derivate, zeigten jedoch eine geringere Hemmwirkung.

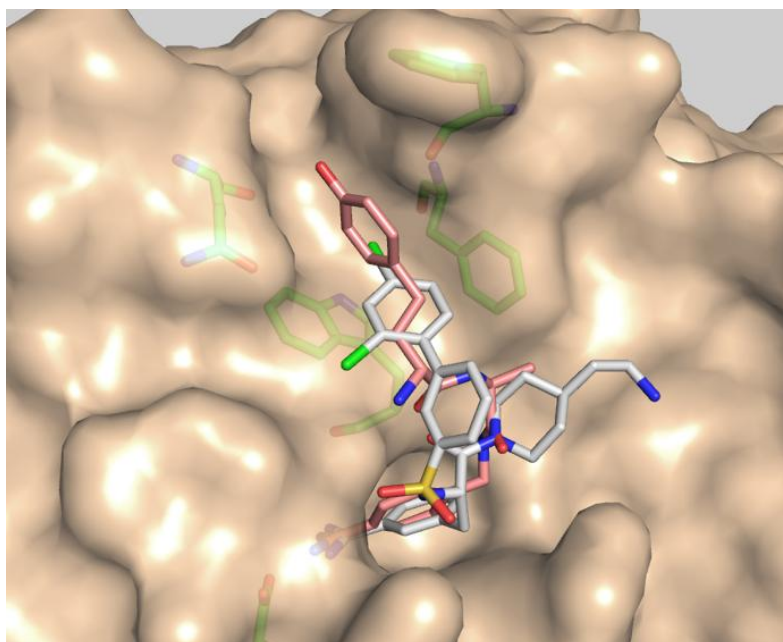


Abbildung 43: Modellierter Komplex der Inhibitoren **27** (Kohlenstoffatome in Weiß, Stickstoff blau, Sauerstoff rot, Schwefel gelb und Chlor grün) und **50** (Kohlenstoffe in rosa) im aktiven Zentrum der Matriptase (PDB: 2GV6), dargestellt mit transparenter Oberfläche in hellbraun. Die Überlagerung der Inhibitoren zeigt, dass der Phenylring des D-hTyr in P3-Position des Inhibitors **50** im Vergleich zum 2,4-Dichlorphenylring des Hemmstoffs **27** etwas anders positioniert ist und tiefer in die S3/4-Tasche hineinragt, die von den Resten Phe97, Phe99, Gln175 und Trp215 (mit grünen Kohlenstoffen) gebildet wird (Grafik entnommen aus^[166]).

Eine Überlagerung der Inhibitoren **27** und **50** in Matriptase (Abbildung 43) zeigte, dass der D-hTyr-Rest von **50** wesentlich tiefer in die S3/4-Tasche ragt und eine andere Lage als der dichlor-substituierte Phenylring des Hemmstoffs **27** einnimmt. Der terminale Phenylring der Biphenyl-3-Sulfonylgruppe des Inhibitors **21** ist näher an den Matriptaserest Phe99 platziert.

Darüber hinaus ist der Ring des D-hTyr von Inhibitor **50** eher vertikal zu Trp215 ausgerichtet, wohingegen der dichlor-substituierte Ring des Inhibitors **27** eher parallel zum Indolring des Trp 215 positioniert ist^[166]. Diese Unterschiede könnten der Grund dafür sein, dass durch den Einbau von chlor- oder methoxysubstituierten D-hPhe-Analoga in P3-Position der substratanalogen Inhibitoren keine Verbesserung der Hemmwirkung erreicht werden konnte.

3.1.3 Weitere Inhibitoren ohne P4-Rest

In einer weiteren Synthesereihe sollte geprüft werden, ob durch verlängerte P3-Reste, welche möglicherweise tiefer in die Bindungstasche eindringen können, eine Verbesserung der Hemmwirkung gegenüber Matriptase erreicht werden kann. Die Synthese der substratanalogen Inhibitoren mit verlängertem P3-Rest ist am Beispiel der Verbindungen **109** und **110** in Abbildung 44 dargestellt.

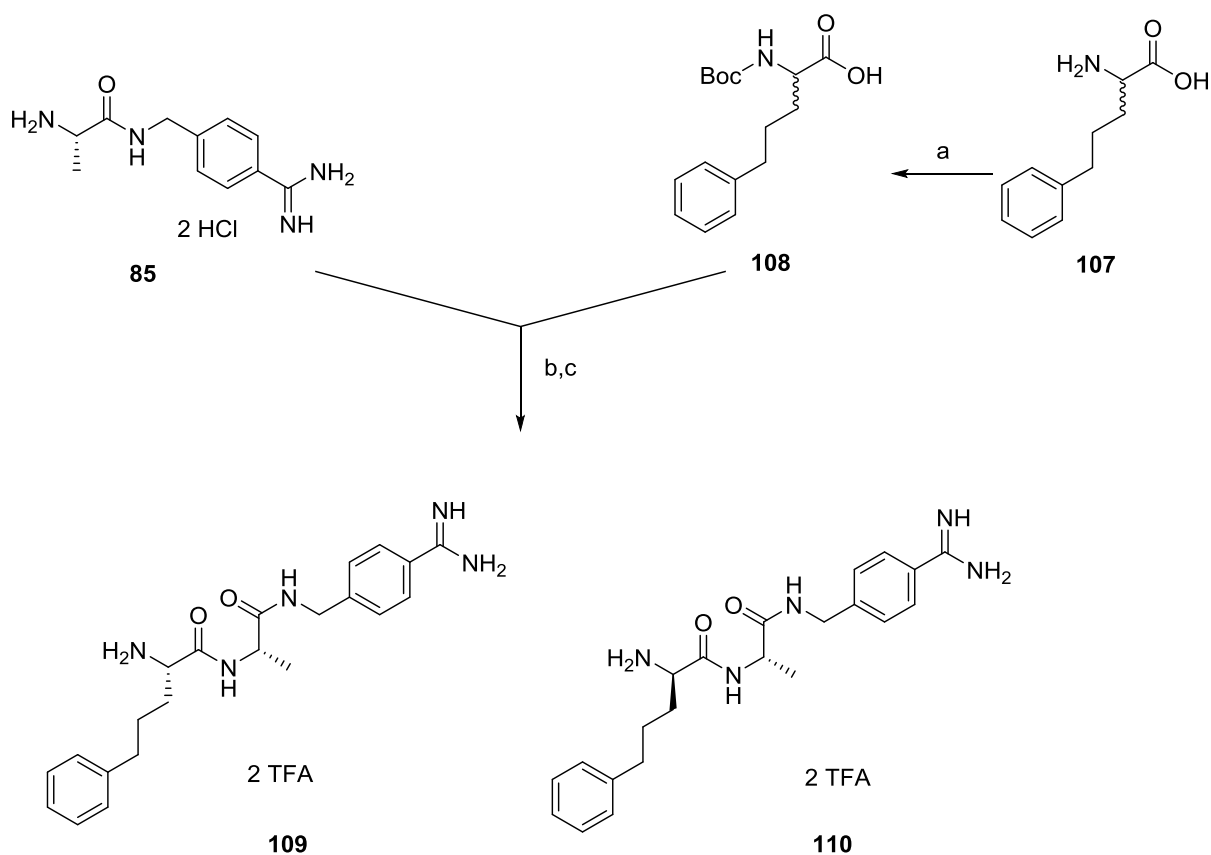


Abbildung 44: Synthese der Inhibitoren mit D/L-Phenylpropylglycin in P3-Position, Reaktionsbedingungen und Reagenzien. (a) 1.2 Äquiv. Boc_2O in Dioxan und Wasser, pH zirka 8,5, eingestellt mit 1N NaOH. (b) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (c) TFA, 1h, RT, präparative HPLC.

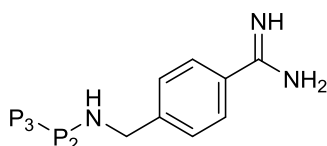
Racemisches H-D/L-Gly(Phpr)-OH (**107**) wurde mittels Boc_2O an seiner Aminofunktion geschützt. Das dabei erhaltene Boc-D/L-Gly(Phpr)-OH (**108**) wurde mit 1 Äquiv. H-Ala4-Amba \times 2 HCl (**85**) unter Verwendung von 1 Äquiv. BOP und 2 Äquiv. DIPEA in DMF gekuppelt. Nach Entfernung des Lösemittels wurde die Schutzgruppe durch Behandlung mit TFA abgespalten und die zueinander diastereomeren Verbindungen **109** und **110** mittels präparativer HPLC getrennt. Die Synthese der Verbindungen **111** und **112** erfolgte auf

analoge Weise unter Verwendung des Intermediats H-Pro-4-Amba \times 2 HCl (**88**). Die nach dem Kupplungsschritt und der Schutzgruppenabspaltung vorliegenden racemischen Inhibitoren wurden mittels präparativer HPLC voneinander getrennt.

Wie zuvor beschrieben, wurde auch bei diesen Verbindungen festgelegt, dass der wirksamere Matriptasehemmstoff in P3-Position einen D-konfigurierten Aminosäurerest enthält.

Die dargestellten Hemmstoffe wurden auf ihre Hemmwirkung gegenüber Matriptase, Thrombin und FXa untersucht (Tabelle 15). Die Durchführung der Messungen ist in Kapitel 5.2 beschrieben.

Tabelle 15: Inhibierung von Matriptase, Thrombin und FXa durch substratanaloge Inhibitoren mit Phenylpropylglycin in P3-Position.



No	P3	P2	K _i (μM)		
			Matriptase	Thrombin	FXa
112	D-Gly(Phpr)	Pro	1,4	0,001	5,6
110	D-Gly(Phpr)	Ala	1,5	0,009	10,7
109	L-Gly(Phpr)	Ala	15,0	0,8	45,4
111	L-Gly(Phpr)	Pro	16,5	0,6	43,8

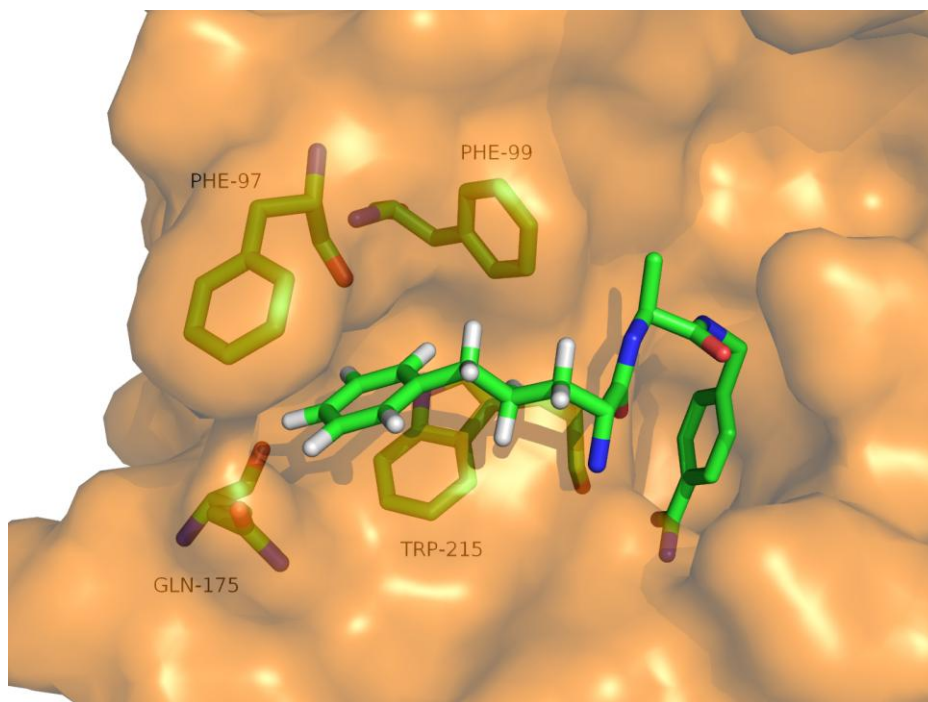


Abbildung 45: Modellierter Komplex des Inhibitors **110** im aktiven Zentrum der Matriptase. Die Oberfläche des Enzyms ist in orange gezeigt, Kohlenstoffe des Inhibitors in grün, Sauerstoffe in rot und Stickstoffe in blau. Von der Matriptase sind nur die Reste Phe97, Phe99, Gln175 und Trp215 der S3/4-Tasche dargestellt. Zur Erstellung der Grafik wurde die P3-Seitenkette des Inhibitors aus Abbildung 40 mittels MOE editiert und das P2 Pro durch Ala ersetzt. Anschließend wurde eine Energieminimierung der P3-Seitenkette und des P2-Restes durchgeführt, alle anderen Reste blieben unverändert.

Aus der in Abbildung 45 gezeigten Lage des Inhibitors ist nicht unmittelbar ersichtlich, warum der K_i -Wert des Inhibitors **110** im Vergleich zum kürzeren Analogon **49** mit D-hPhe ca. 30-fach reduziert ist (1,4 μM vs. 0,044 μM). Der P3-Aromat des Hemmstoffs **110** scheint relativ günstig in der S3/4-Tasche über Trp215 platziert zu sein. Es kann jedoch sein, dass durch die zusätzlichen Freiheitsgrade der verlängerten Alkylkette die Konformation der P3-Seitenkette flexibler wird und daher nicht mehr so fixiert in der distalen Bindetasche liegt.

3.1.4 Inhibitoren mit P4-Rest

Aus vorigen Arbeiten war bekannt, dass die Abwesenheit eines P4-Restes die Hemmwirkung gegenüber Thrombin und FXa deutlich reduziert^[82]. Da die Hemmwirkung gegenüber Matriptase durch das Hinzufügen eines P4-Restes jedoch in der Regel auch etwas stärker wird, wurde eine Reihe von Substanzen mit P4-Rest (Tabelle 16) hergestellt. Die Synthese der substratanlogen Hemmstoffe **113** und **114** ist am Beispiel der Verbindung **113** in Abbildung 46 gezeigt.

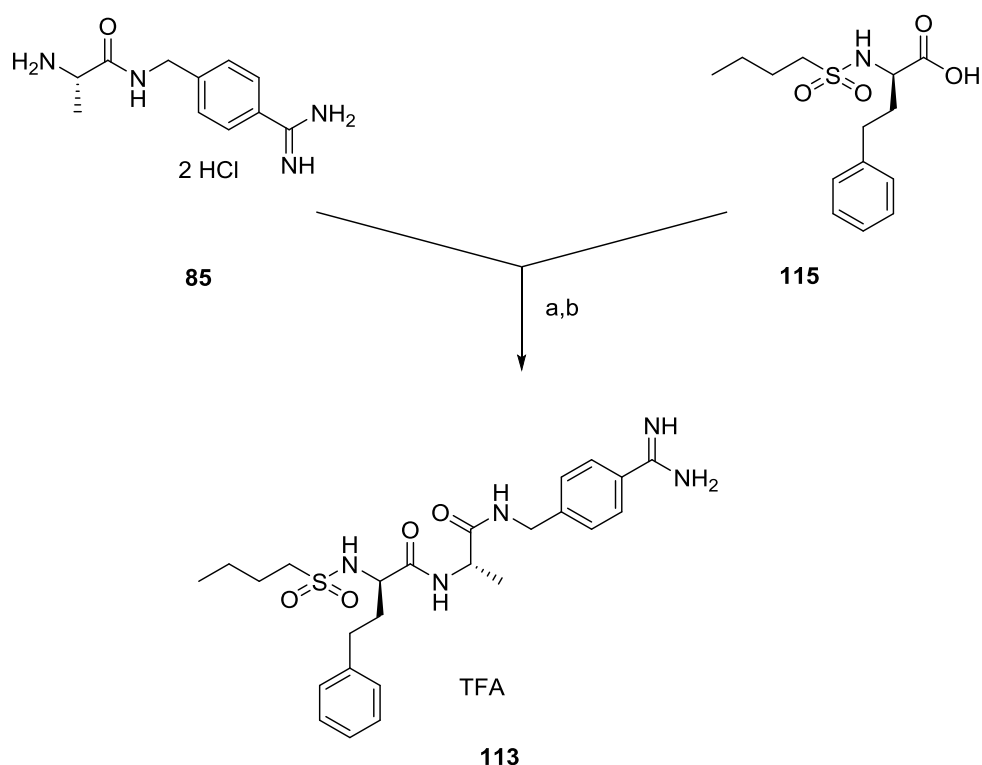


Abbildung 46: Synthese der Inhibitoren, Reaktionsbedingungen und Reagenzien. (a) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (b) präparative HPLC.

H-Ala-4-Amba \times 2 HCl (**85**) wurde unter Verwendung von 1 Äquiv. BOP und 2 Äquiv. DIPEA in DMF mit 1 Äquiv. Butylsulfonyl-D-hPhe-OH (**115**) gekuppelt. Nach Entfernung des Lösemittels wurde die Verbindung **113** mittels präparativer HPLC gereinigt. Die Synthese des Hemmstoffs **114** erfolgte analog unter Verwendung von Methylsulfonyl-D-hPhe-OH.

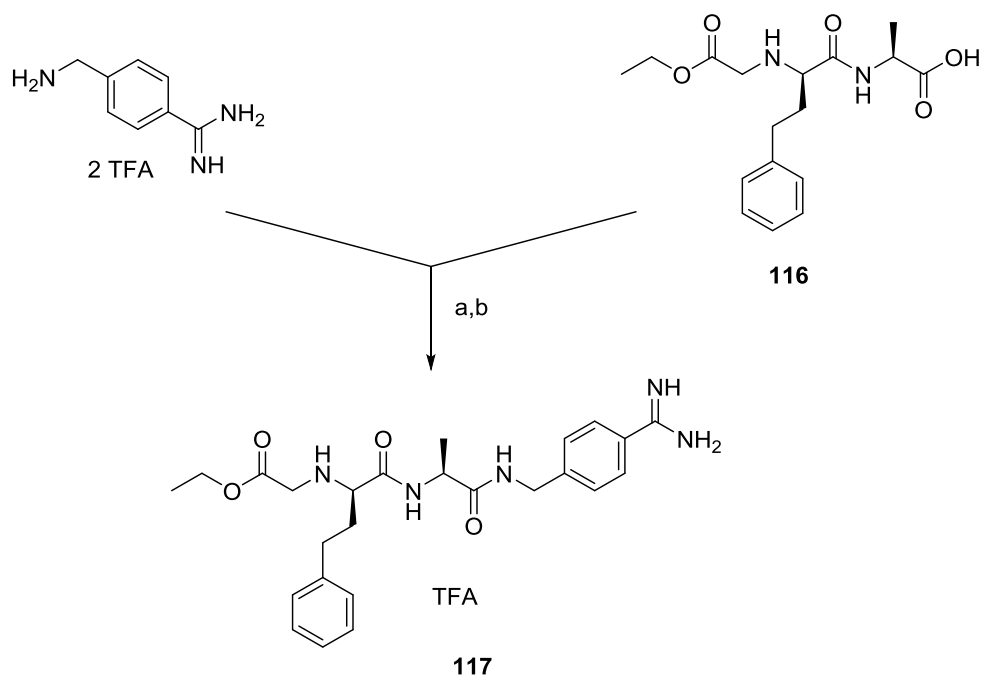
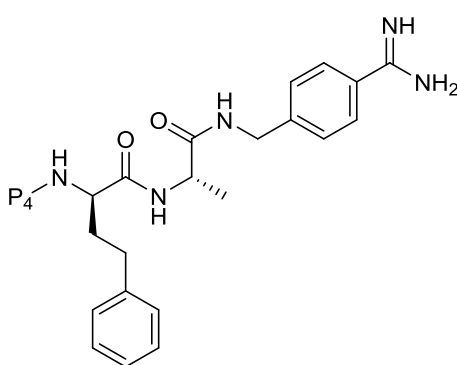


Abbildung 47: Synthese des Hemmstoffes **117**, Reaktionsbedingungen und Reagenzien. (a) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (b) Präparative HPLC.

Verbindung **117** wurde durch Kupplung von 1 Äquiv. H-D-N(EtO-Carboxymethyl)hPhe-Ala-OH (**116**) mit 4-Amidinobenzylamin \times 2 TFA unter Verwendung von 1 Äquiv. BOP und 2 Äquiv. DIPEA in DMF erhalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (Abbildung 47).

Die dargestellten Hemmstoffe wurden auf ihre Hemmwirkung gegenüber Matriptase, Thrombin und FXa untersucht, die Ergebnisse sind in Tabelle 16 gezeigt.

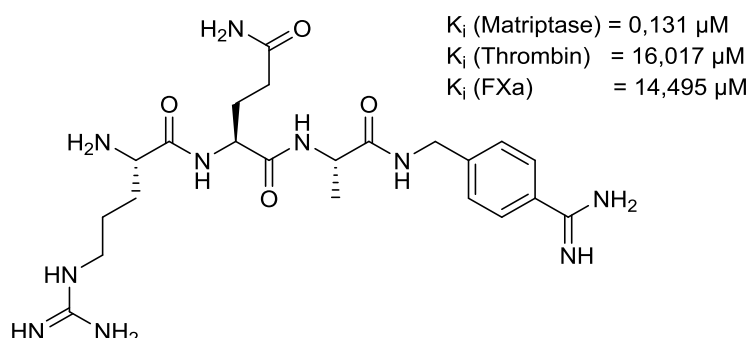
Tabelle 16: Inhibierung von Matriptase, Thrombin und FXa durch substratanaloge Inhibitoren mit P4-Rest der allgemeinen Struktur



No	P4	K_i (μ M)		
		Matriptase	Thrombin	FXa
113	Butylsulfonyl	0,052	0,055	0,006
114	Methylsulfonyl	0,159	0,086	0,128
117	H-N(Ethoxycarbonylmethyl)	0,544	0,259	1,564
49	H	0,044	0,73	1,79

3.1.5 Substratanaloger Inhibitor basierend auf der Aktivierungssequenz

Angeregt durch diese Ergebnisse wurde der ebenfalls auf der P4-P1-Aktivierungssequenz der Matriptase basierende Inhibitor **118** (Abbildung 48) hergestellt, der im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Inhibitoren mit Glutamin in P3-Position einen L-konfigurierten Aminosäurerest besitzt.



Die Verbindung **118** zeigte eine schwächere Matriptasehemmung im Vergleich zu vielen der zuvor beschriebenen Derivate, wie Inhibitor **50** (Tabelle 17).

No	K_i (μM)		
	Matriptase	Thrombin	FXa
50	0,026	0,30	0,57
118	0,131	16,017	14,495

55

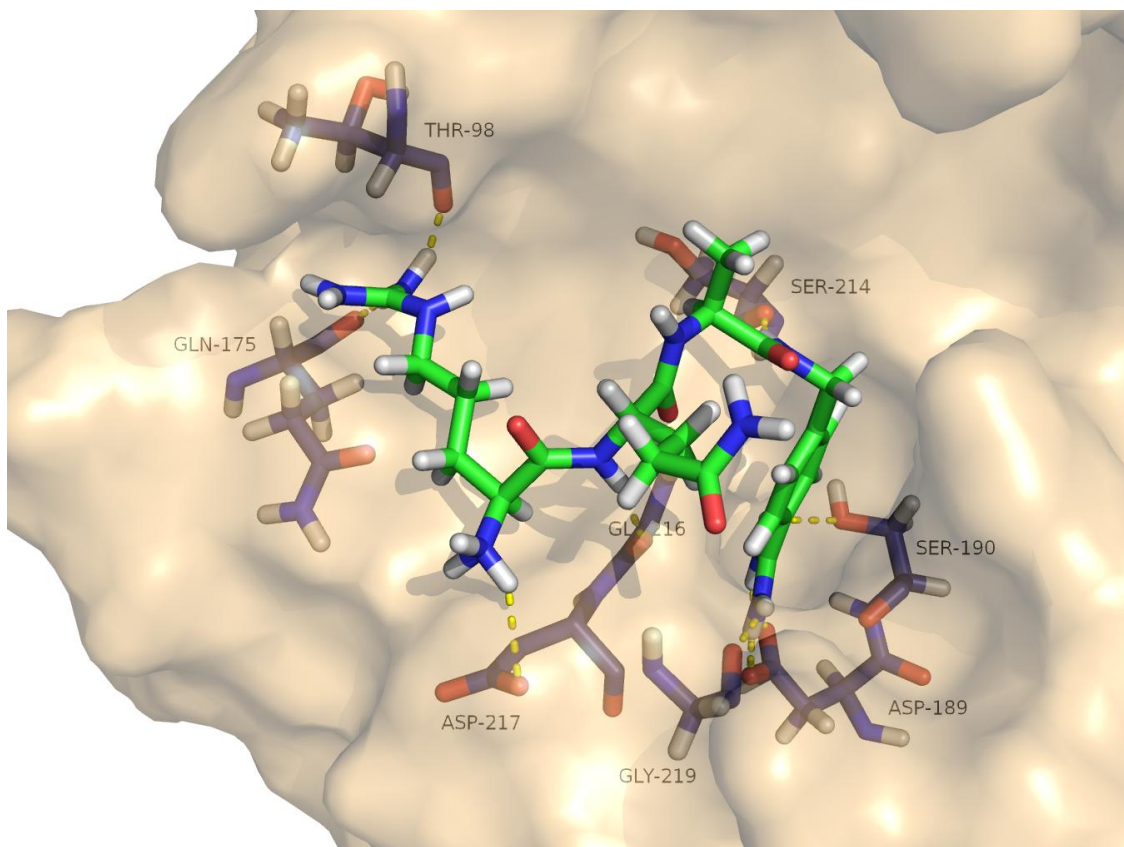


Abbildung 49: Modellierter Komplex des Inhibitors **118** (Kohlenstoffatome in grün, Wasserstoff weiß, Stickstoff blau und Sauerstoff rot) im aktiven Zentrum der Matriptase (2GV6), dargestellt mit hellbrauner transparenter Oberfläche. Charakteristische Matriptasereste sind mit dunkelblauen Kohlenstoffen dargestellt, polare Wechselwirkungen als gelbe, gestrichelte Linien.

Dazu wurden zunächst die Strukturen 3UTU^[169] (Thrombin im Komplex mit einem substratanalogen Inhibitor, der ein L-Asn-Pro-4-Amba als P3-P1-Segment enthält) und 2GV6 (Komplex eines 3-Amidinophenylalanin-Derivats mit Matriptase) mittels PyMOL überlagert. Danach wurden die Thrombinkoordinaten gelöscht und der Inhibitor in der 3UTU-Struktur mittels MOE editiert, wobei dessen P3-Rest durch Gln und der P4-Rest durch Arg ersetzt wurden. Anschließend erfolgte eine Energieminimierung der Seitenketten der P3- und P4-Reste mittels MOE, alle anderen Reste blieben fixiert. Der modellierte Komplex zeigt die erwarteten Wechselwirkungen der Amidinogruppe des Inhibitors mit Asp189 und Ser190 am Boden der S1-Tasche. Das P1-Amid-NH des Inhibitors bindet an den Carbonyl-Sauerstoff des Ser214, weitere H-Brücken bestehen zwischen dem P3-Amid-NH und dem Carbonylsauerstoff von Gly216, sowie zwischen dem P3-Carbonylsauerstoff und dem Amid-NH von Gly216, wie sie auch in dem Thrombinkomplex 3UTU beschrieben wurden.

3.1.6 Fazit

Die Matriptasehemmung der bereits bekannten Verbindung **50** ($K_i = 0,026 \mu\text{M}$) konnte durch keine der im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu dargestellten substratanalogen Inhibitoren (Tabelle 14 bis Tabelle 17) verstärkt werden. Somit scheint D-h-Tyr, zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit, der am besten geeignete Rest für die Position P3 zu sein. Ob eine Verbesserung der Hemmwirkung durch veränderte Substitutionsmuster am P3-Aromaten erreicht werden kann, muss im Rahmen weiterer Arbeiten geklärt werden.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass eine Erhöhung der Selektivität von Matriptasehemmstoffen gegenüber Thrombin und FXa durch Entfernung des P4-Restes möglich ist.

Im folgenden Kapitel wird die Entwicklung substratanaloger Hemmstoffe der Serinprotease KLK7 beschrieben, welche ebenso wie Matriptase an der Entstehung einer Reihe von Erkrankungen epithelialer Gewebe beteiligt ist und durch Matriptase aktiviert werden kann^[84].

3.2 Kallikrein 7

Das für die Untersuchungen verfügbare KLK7 lag in unbekannter Konzentration gelöst in einem 50 mM Tris-Puffer (pH = 8, Kapitel 5.2.4) vor. Aufgrund der geringen verfügbaren Enzymmenge wurde keine *active-site*-Titration zur Konzentrationsbestimmung des Enzyms durchgeführt.

Zur Aktivitätsprüfung des Enzyms wurde zu Beginn das kommerziell verfügbare Substrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Peptide Institute) verwendet und die enzymkinetischen Parameter K_M und V_{max} ermittelt. Die Messung erfolgte wie unter 5.2.4.1 beschrieben, die Substratkonzentrationen im Ansatz wurden im Bereich von 2,86 bis 72 μM variiert. Mittels Lineweaver-Burk-Auftragung wurden für dieses Substrat ein V_{max} -Wert von $2,12 \cdot 10^{-4}$ RFU/s und ein K_M -Wert von 140 μM bestimmt.

3.2.1 Substrate des KLK7

Aufgrund der schlechten Löslichkeit in Puffer muss das kommerziell erhältliche Substrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC in DMSO angelöst werden. Es wird durch KLK7 nur moderat umgesetzt und besitzt einen relativ hohen K_M -Wert, wodurch höhere Substratkonzentrationen in den Messungen notwendig sind, was den Substratverbrauch erhöht. Daher sollte zu Beginn der Arbeiten ein besseres Substrat für die weiteren Messungen mit den Inhibitoren entwickelt werden. Aus früheren Arbeiten^[91] war bekannt, dass KLK7 Tyr in P1-Position bevorzugt, während Substrate mit Phe, Met, Nle und Ala in P1-Position deutlich schlechter gespalten werden. Dennoch wurden auch zwei Verbindungen mit Phe in Position P1 untersucht^[91]. Als Maß für die Qualität der Substrate wurde der Quotient aus V_{max} und K_M verwendet. Um die Löslichkeit zu verbessern, wurde D-Arg in P3-Position eingebaut.

Die Substrate wurden alle nach einer ähnlichen Strategie ausgehend vom P1-AMC-Baustein hergestellt, im Folgenden soll daher nur die allgemeine Synthesestrategie für das geeignetste Substrat **119** beschrieben werden (Abbildung 50).

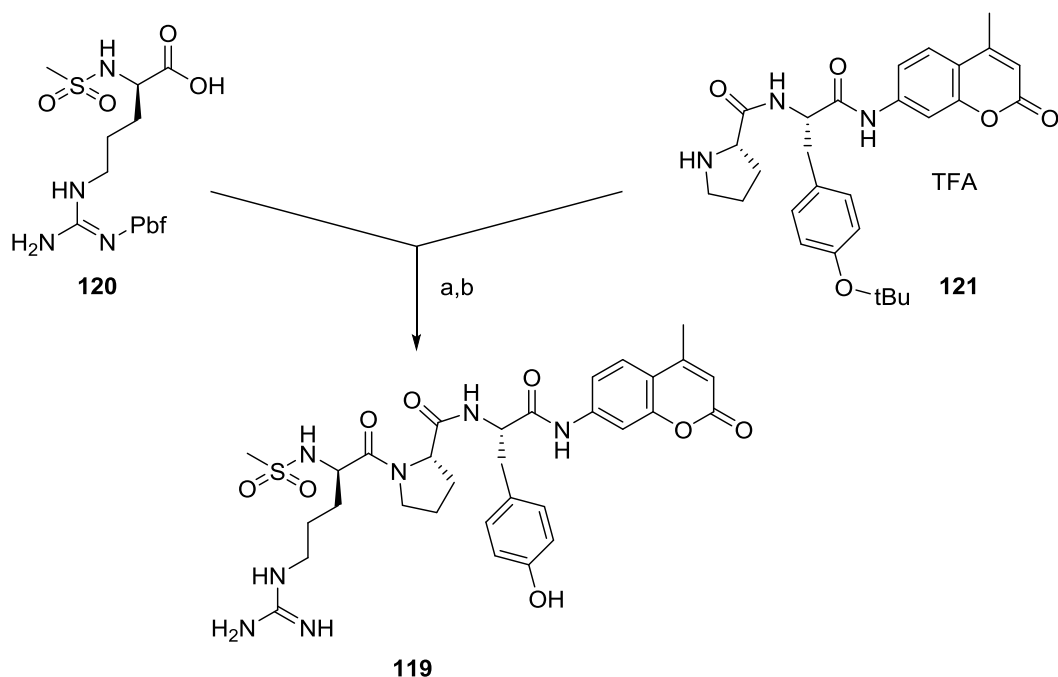


Abbildung 50: Synthese des Substrats **119**, Reaktionsbedingungen und Reagenzien. (a) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (b) TFA, 4h, 40 °C, präparative HPLC.

Zur Synthese des Substrates **119** wurde 1 Äquiv. H-Pro-Tyr(tBu)-AMC x TFA (**121**) unter Verwendung von 1 Äquiv. BOP und 2 Äquiv. DIPEA in DMF mit 1 Äquiv. Mes-D-Arg(Pbf)-OH (**120**) gekuppelt. Nach Entfernung des Lösemittels wurden die Schutzgruppen durch Behandlung mit TFA abgespalten und das Endprodukt **119** mittels präparativer HPLC gereinigt.

Die kinetischen Parameter der Substrate wurden wie in Kapitel 5.2.4.1 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 18 gezeigt.

Tabelle 18. Kinetische Parameter der untersuchten KLK7-Substrate.

Nr.	Formel	K_M (μM)	V_{\max} ($\mu\text{M/s}$)	V_{\max}/K_M (1/s)
122	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	227	$5,81 \times 10^{-4}$	$2,56 \times 10^{-6}$
123	Mes-D-Arg-Pro-Phe-AMC	78	$6,49 \times 10^{-4}$	$8,32 \times 10^{-6}$
124	Mes-D-Arg-Leu-Tyr-AMC	350	$2,39 \times 10^{-3}$	$6,83 \times 10^{-6}$
119	Mes-D-Arg-Pro-Tyr-AMC	109	$7,16 \times 10^{-3}$	$6,57 \times 10^{-5}$
125	BzIs-D-Arg-Pro-Tyr-AMC	109	$2,03 \times 10^{-3}$	$1,86 \times 10^{-5}$
126	BzIs-D-Arg-Pro-Phe-AMC	24	$1,49 \times 10^{-4}$	$6,19 \times 10^{-6}$
127	Mes-D-Arg-Tle-Tyr-AMC	179	$2,32 \times 10^{-3}$	$1,30 \times 10^{-5}$

Viele der neu hergestellten Substrate werden effektiver als das Ausgangssubstrat **122** umgesetzt. Ein Grund hierfür kann im Einbau des D-Arg in Position P3 liegen, dessen Seitenkette vermutlich die S3/4-Tasche des KLK7 im Vergleich mit den L-konfigurierten

Substraten besser adressieren kann. Die niedrigsten K_M -Werte wurden für die P1-Phe-Substrate **126** und **123** bestimmt, die höchsten V_{max} -Werte für die beiden P1-Tyr-Verbindungen **119** und **125**. Bezüglich des Terms V_{max}/K_M ist das Substrat **119** die günstigste Verbindung und ca. 25-fach besser geeignet als das kommerziell erhältliche Ausgangsderivat **122**. Deshalb wurde das gut lösliche Substrat **119** für die späteren Inhibitormessungen verwendet, erste Messungen zum Screening der Hemmstoffe erfolgten noch mit dem von Anfang an verfügbaren Substrat **122**.

3.2.2 Screening vorhandener Inhibitoren

Bisher wurden im Arbeitskreis neben den furinartigen Proproteinkonvertasen vor allem trypsinartige Serinproteasen wie Matriptase^[166, 170], Urokinase^[23, 171-173], Plasmin^[174-175], Thrombin^[80, 169] und Faktor Xa untersucht, die alle ein Asp189 am Boden der S1-Tasche besitzen und daher bevorzugt Substrate und Inhibitoren mit basischen P1-Resten erkennen. Jedoch gibt es auch andere Inhibitorstrukturen, vor allem für die Gerinnungsproteasen Thrombin^[80, 176] und Faktor Xa^[68], die in P1-Position einen meta-Chlor-substituierten Aromaten besitzen. Dessen Chloratom weist auf das Zentrum der phenolischen Seitenkette eines hochkonservierten Tyr228, das in fast allen Serinproteasen der S1-Familie vorhanden ist. Diese Interaktion ist für die Hemmwirkung entscheidend, dabei muss ein Wassermolekül verdrängt werden, dass in vielen Kristallstrukturen über dem Tyr228 platziert ist. Diese Inhibitoren bilden jedoch keinerlei Wechselwirkungen zum Asp189 aus.

Als Gemeinsamkeit besitzen Thrombin und Faktor Xa einen Alaninrest in Position 190 direkt neben Asp189. Interessanterweise lassen sich die trypsinartigen Serinproteasen mit einem Ser190 an dieser Position in der Regel deutlich schlechter durch Inhibitoren mit chloraromatischen P1-Resten hemmen. Deshalb wurde vermutet, dass sich bei den Ala190-Proteasen das über dem Tyr228 lokalisierte Wassermolekül im Vergleich zu den Proteasen mit Ser190 leichter verdrängen lässt, was zu einer stärkeren Hemmung durch Hemmstoffe mit m-Chlor-aromatischen P1-Resten führt. Andererseits gibt es auch einige Proteasen mit Ala190, wie Plasmakallikrein, Matriptase-2, HAT oder Faktor XIIa, die sich ebenfalls nur schlecht durch Hemmstoffe mit chloresubstituierten P1-Aromaten hemmen lassen. Demzufolge muss es noch andere Gründe geben, warum sich einige trypsinartige Serinproteasen durch diese Hemmstoffe ohne basischen P1-Rest effektiv hemmen lassen und andere nicht.

Da das KLK7 mit seiner chymotrypsinartigen Substratspezifität ein ungeladenes Asn189 und ein Ala190 in der S1-Tasche besitzt^[145], wurde vermutet, dass sich diese Protease ebenfalls durch Hemmstoffe mit chloraromatischen P1-Resten hemmen lässt. Diese Annahme sollte durch das Screening erster Hemmstoffe mit solchen P1-Resten geprüft werden, die im Arbeitskreis aus den Arbeiten mit Thrombin- und FXa-Inhibitoren bereits vorhanden waren.

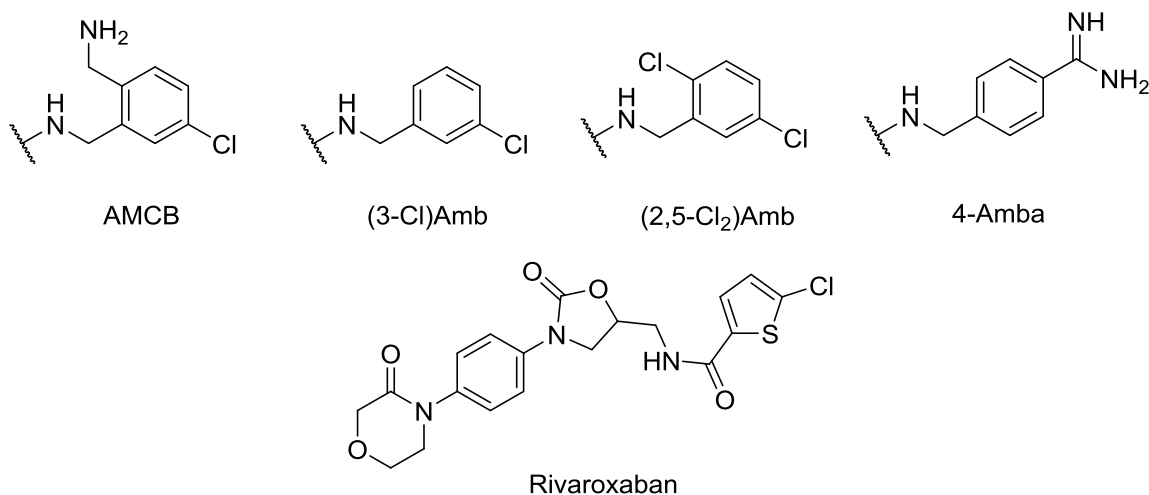
Da anfänglich nur geringe Mengen an KLK7 verfügbar waren, wurde zum Screening der Hemmstoffe die verbleibende Restaktivität des Enzyms (siehe 5.2.4.2) bei einer

Inhibitorkonzentration von 10 μM im Ansatz bei konstanter Substratkonzentration bestimmt (Tabelle 19).

Tabelle 19: Hemmwirkung vorhandener Inhibitoren auf KLK7. Das initiale Screening wurde mit dem kommerziellen Substrat **122** (47 μM im Ansatz) bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μM durchgeführt.

Nr.	P4	P3	P2	P1	Restaktivität in %
1	Bzls	D-Arg	Pro	AMCB	7,1
128	Bzls	D-Cha ^a	Pro	AMCB	9,2
129	Bzls	D-Arg	Pro	(3-Cl)Amb	9,3
130	Bzls	D-Arg	Pro	(2,5-Cl ₂)Amb	20,7
131	Bzls	D-Leu	Pro	AMCB	33,3
132	Bzls	Gly	Pro	AMCB	38,8
133	H	D-Cha	Pro	4-Amba	43,2
134	Bzls	D-Val	Pro	AMCB	66,5
135	(3-Cl,4-MeO)-Bzs	Asn(4-CN-Bzl)	Pro	AMCB	72,7
136	H	D-Phe	Pro	AMCB	84,6
137	Bzls	D-Ala	Pro	AMCB	91,7
138	Rivaroxaban				94,5

^a D-Cyclohexylalanin



Wie vermutet, zeigten die Verbindungen mit einem m-Chlor-substituierten aromatischen P1-Rest eine signifikante Hemmwirkung auf KLK7, die stärkste Wirksamkeit wurde für den Inhibitor **1** (Abbildung 51) mit der Struktur Bzls-D-Arg-Pro-AMCB bestimmt. Das P3-Gly-Derivat **132** und der einzige Inhibitor **135** mit einem in der Seitenkette modifizierten L-Asn als P3-Rest waren beide deutlich weniger wirksam als die D-Arg-Hemmstoffe. Für den kommerziell verfügbaren nichtpeptidischen FXa-Hemmstoff Rivaroxaban mit einem Chlor-Thiophencarbonsäurerest in P1-Position wurde nur eine marginale Hemmwirkung festgestellt.

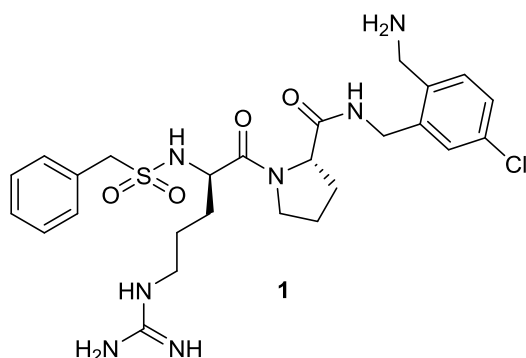


Abbildung 51: Inhibitor 1.

Für den AMCB-Rest war aus Kristallstrukturuntersuchungen im Komplex mit Thrombin^[80] bekannt, dass das 5-Cl-Atom des P1-Aromaten eine Halogen- π -Interaktion mit Tyr228 der S1-Tasche ausbildet, das ebenfalls bei KLK7 an dieser Position vorhanden ist (Abbildung 52). Analoge Halogen- π -Interaktion zwischen den P1-Rest und Tyr228 sind auch aus Arbeiten zur Entwicklung von FXa-Hemmstoffen, wie Rivaroxaban, bekannt^[177-178] bekannt.

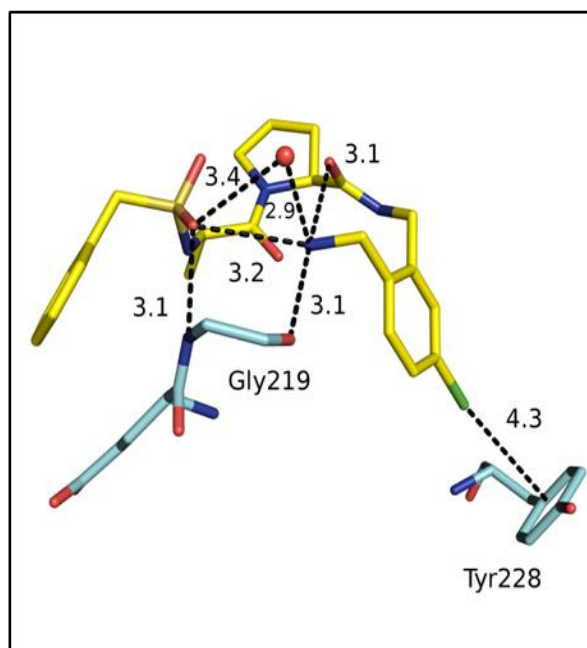


Abbildung 52: Wechselwirkungen des Inhibitors Bzls-D-Ala-Pro-AMCB (**1**) (Kohlenstoffe gelb, Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Chlor grün) im Komplex mit Thrombin. Vom Thrombin sind nur die Reste Tyr228, Gly219 und Glu217 gezeigt (Kohlenstoffe hellblau, Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Chlor grün). Die Abstände sind in Å angegeben. Grafik entnommen aus^[80].

Auch die 2-Aminomethyl-Gruppe des AMCB ist an mehreren Wechselwirkungen beteiligt, im Falle des Thrombins wurden polare Kontakte zu den Carbonyl-Gruppen von Gly216 (in Abbildung 52 nicht gezeigt) und Gly219 gefunden^[80], jeweils über eine Distanz von 3,1 Å. Prinzipiell sollten einige dieser Wechselwirkungen auch bei der Hemmung des KLK7 möglich sein, wie zum Tyr228 oder den Carbonylgruppen der Reste Gly216 und/oder Pro219.

Wie in Abbildung 52 zu erkennen, gibt es keinerlei Wechselwirkungen des P1-AMCB-Restes zur Seitenkette des Asp189 am Boden der S1-Tasche des Thrombins. Daher wurde vermutet,

dass Verbindungen mit AMCB in P1-Position auch KLK7 mit einem Asn189 an dieser Position hemmen könnten.

Aus diesem 1. Screening wurde auch ersichtlich, dass ein D-Arg in P3-Position in diesen substratanalogen Strukturen etwas besser als die untersuchten ungeladenen Reste geeignet ist, was möglicherweise auf Kation- π -Interaktionen mit Trp215 am unteren Rand der S3/4-Tasche zurückzuführen ist.

Zur Klärung eines möglichen Bindungsmodus wurde ein Komplex des Inhibitors **1** in KLK7 erstellt (Abbildung 53). Hierzu wurden die Strukturen 3EQ0 (**1** in Thrombin) und 2QXI (KLK7 im Komplex mit dem Inhibitor Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-CMK) mittels PyMol überlagert.

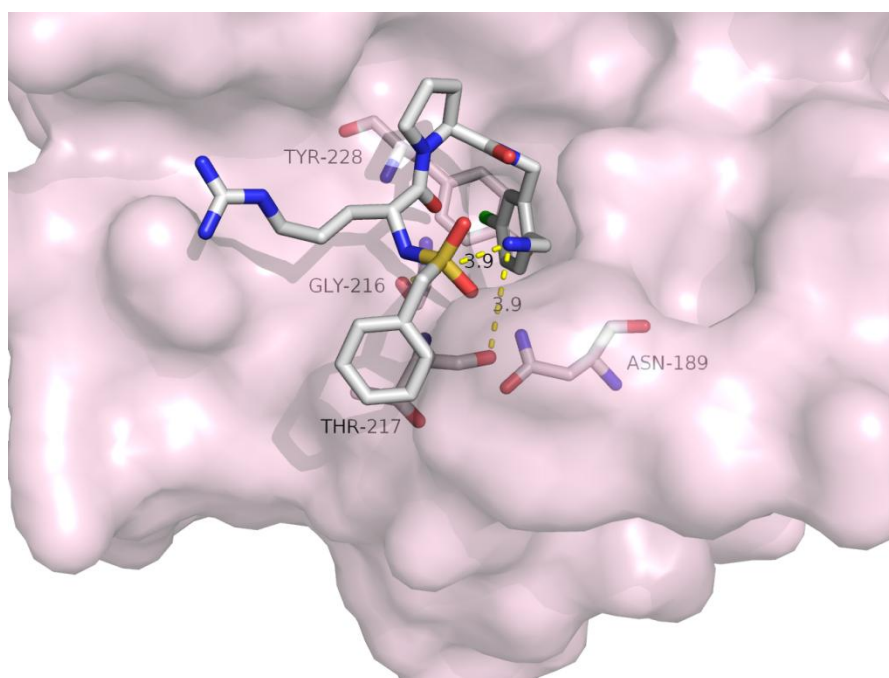


Abbildung 53: Modellierter Komplex des Inhibitors **1** (Bzls-D-Arg-Pro-4-AMCB, Kohlenstoffe weiß, Stickstoff blau, Sauerstoff rot, Schwefel gelb und Chlor grün) in KLK7 (PDB: 2QXI, Oberfläche in transparentem hellrosa). Die Atome der KLK7-Reste Asn189, Gly216, Thr217 Tyr228 sind analog eingefärbt. Ausgewählte Abstände sind als gestrichelte Linien gezeigt und in Å angegeben.

Für die polaren Kontakte der Aminomethylgruppe des P1-Aromaten des Inhibitors **1** zu den Carbonyl-Sauerstoffen von Gly216 und Thr217 wurden Distanzen von jeweils 3,9 Å gefunden. Jedoch sind diese Abstände für effektive Wasserstoffbrückenbindungen zu lang. Die vermutete Ausrichtung des Chlorsubstituenten am P1-Aromaten in Richtung der Tyr228-Seitenkette ist allerdings sehr ähnlich wie in vielen Kristallstrukturen des Thrombins oder des FXa im Komplex mit Chloraromaten beschrieben.

3.2.3 Modifizierung der P1-Position

In der Folge wurde geprüft, ob durch andere P1-Reste eine Verbesserung der Hemmwirkung gegenüber KLK7 erreicht werden kann. Da bei den initialen Messungen (Tabelle 19) festgestellt wurde, dass eine m-Chlor-Substitution an der P1-Gruppe vorteilhaft zu sein scheint^[176-180], wurde bei der Auswahl weiterer P1 Reste ein besonderes Augenmerk auf

Halogen-substituierten P1-Aromaten gelegt. Jedoch wurden auch noch weitere Reste ohne Halogen an P1-Position getestet. Als Leitstruktur der Untersuchung diente Verbindung **1** deren P4-P2-Segment (Bzls-D-Arg-Pro) nicht verändert wurde.

Die in der vorliegenden Messreihe untersuchten Verbindungen wurden, sofern nicht im Arbeitskreis verfügbar, nach folgendem Schema (Abbildung 54) dargestellt. Die Synthese ist am Beispiel der Verbindung **140** beschrieben. Dabei wurde der in der Seitenkette des D-Arg Restes ungeschützte Baustein Bzls-D-Arg-Pro-OH an verschiedene P1-Reste gekuppelt und anschließend das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt. Weitere Verbindungen wurden analog unter Verwendung anderer P1-Reste hergestellt.

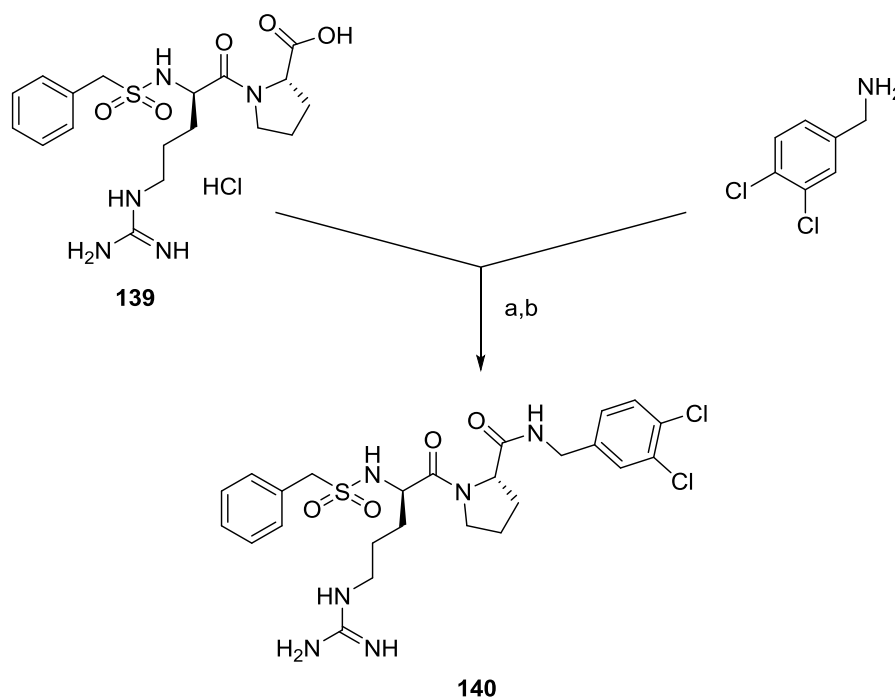
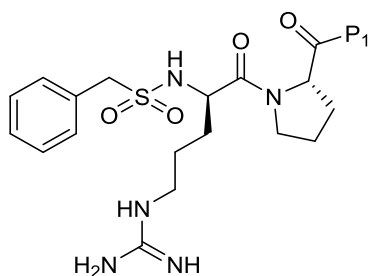


Abbildung 54: Synthese des Inhibitors **140**, Reaktionsbedingungen und Reagenzien. (a) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (b) Präparative HPLC.

Zur Synthese des Inhibitors **140** wurde 1 Äquiv. Bzls-D-Arg-Pro-OH \times HCl (**139**) unter Verwendung von 1 Äquiv. BOP und 2 Äquiv. DIPEA in DMF mit 1 Äquiv. 3,4-Di-Chlor-Benzylamin gekuppelt und mittels präparativer HPLC gereinigt.

Es wurde die bei Verwendung der untersuchten Hemmstoffe verbleibende Restaktivität bestimmt (siehe 5.2.4.2). Die Konzentration der vermessenen Inhibitoren im Messansatz betrug hierbei jeweils 10 μ M. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 20 gezeigt. Zum Vergleich wurde die bereits in Tabelle 19 zuvor beschriebene Verbindung **1** und einige weitere Derivate nochmals mit dem neuen Substrat **119** vermessen.

Tabelle 20: Modifizierung der P1-Position. Die Restaktivitäten wurden in Gegenwart des Substrates **119** (70 μM) mit einer Inhibitorkonzentration von 10 μM im Ansatz bestimmt.



Nr.	P1	Restaktivität in %
1		8,0
129		20,6
130		23,8
140		31,5
141		49,1
142		56,8
143		64,9
144		77,0
31		88,4
145		92,6
146		93,6
147		94,9
148		96,8
149		98,7

Die vier wirksamsten Inhibitoren besitzen alle ein Chlor-Atom in meta-Position am P1-Aromaten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich zwischen diesem Chlor-Atom und der Seitenkette des Tyr228 ebenfalls Halogen- π -Interaktionen ausbilden, wie es von zahlreichen Strukturen des Thrombins im Komplex mit analogen Inhibitoren bekannt ist (Abbildung 52). Jedoch wurde eine sehr schwache Hemmwirkung für die Verbindung **147** festgestellt, die ebenfalls diese Chlorsubstitution besitzt, jedoch noch zusätzlich mit einer Hydroxylgruppe in para-Position modifiziert ist, die offenbar stört.

Der Vergleich der Hemmwirkung der Inhibitoren **1** und **129** zeigt, dass sich die Restaktivität nach Entfernung des Aminomethylrestes in ortho-Position erhöht. Demzufolge trägt die Aminomethylgruppe in ortho-Position des P1-Aromaten zur Hemmung bei.

Der Inhibitor **148** mit dem Chlorthiophen-Rest in P1-Position, der im Rivaroxaban^[181] als P1-Rest eingebaut wurde, ist nur ein sehr schwacher Hemmstoff. Die Verbindung ist viel schwächer wirksam als die Verbindung **129** mit dem m-Chlor-substituierten Benzylamin.

Alle Inhibitoren ohne die m-Chlor-Substitution am P1-Aromaten zeigten generell eine hohe Restaktivität und demzufolge schwache Hemmwirkung. Dies ist ein weiteres Indiz für den Beitrag der m-Chlor-Substitution am P1-Aromaten substratanaloger Inhibitoren für die KLK7-Hemmung.

Wie erwartet, zeigt das P1-Amba-Derivat **31**, das ein sehr guter Inhibitor zahlreicher trypsinartiger Serinproteasen wie Thrombin ($K_i = 0,0035 \mu\text{M}$) und FXa ($K_i = 0,0029 \mu\text{M}$) ist, nur eine relativ schwache Hemmwirkung auf KLK7. Normalerweise sollte das Benzamidin sterisch in die S1-Tasche des KLK7 mit dem Asn189 am Boden passen, da dieser Rest eine vergleichbare Größe wie Asp189 hat. Offenbar gibt es jedoch keine günstigen Wechselwirkungen zwischen dem Amidin und dem ungeladenen Seitenkettenamid des Asn189 in KLK7.

3.2.4 Modifizierung der P3-Position

Im Folgenden wurde geprüft, ob durch Austausch des D-Arg-Restes in P3-Position dieses substratanalogen Inhibortyps eine Verbesserung der Hemmwirkung gegenüber KLK7 möglich ist.

Die in dieser Serie neu synthetisierten Verbindungen wurden nach dem in Abbildung 55 gezeigten Schema dargestellt, einige Verbindungen waren bereits im Arbeitskreis verfügbar. Unter anderem wurden auch die Chlor-substituierten Homophenylalanine eingebaut, die bereits zuvor zur Synthese der substratanalogen Matriptasehemmstoffe hergestellt wurden. Die Synthese ist am Beispiel der Verbindung **153** gezeigt, weitere Verbindungen wurden analog mit anderen Benzylsulfonyl-geschützten Aminosäuren hergestellt.

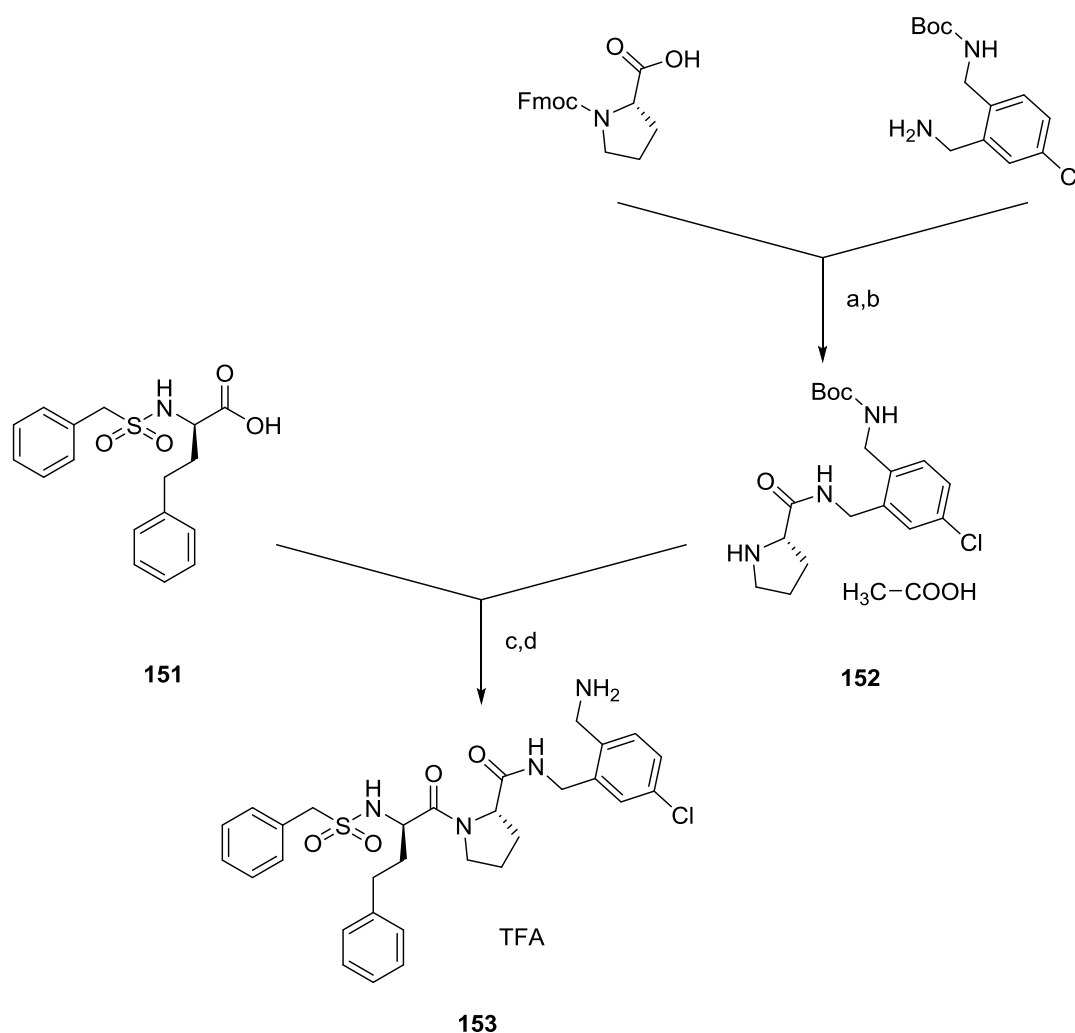
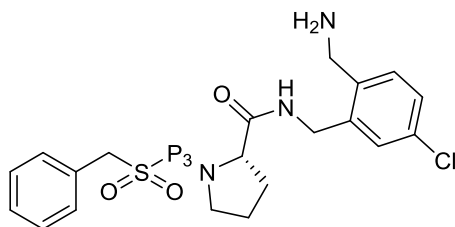


Abbildung 55: Synthese der Inhibitoren, Reaktionsbedingungen und Reagenzien. (a) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (b) 10 % Diethylamin in DMF, RT, HOAc. (c) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (d) TFA, 1h, RT, präparative HPLC.

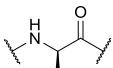
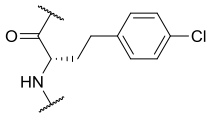
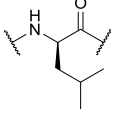
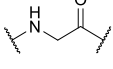
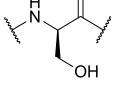
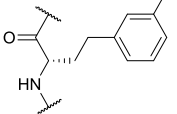
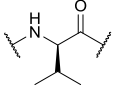
Zur Synthese des Inhibitors **153** wurde 1 Äquiv. Bzls-D-hPhe-OH (**151**) unter Verwendung von 1 Äquiv. BOP und 2 Äquiv. DIPEA in DMF mit 1 Äquiv. des am P1-Rest Boc-geschützten P2-P1-Segments (**152**) gekuppelt und nach Schutzgruppenabspaltung durch präparative HPLC aufgereinigt.

Zur Bestimmung der Hemmwirkung auf KLK7 wurde wiederum die verbleibende Restaktivität bestimmt (siehe 5.2.4.2). Die Konzentration der vermessenen Inhibitoren im Messansatz betrug hierbei jeweils 10 μ M, als Substrat wurde Verbindung **119** mit einer Konzentration von 50 μ M im Ansatz verwendet. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 21 gezeigt. Aufgrund der starken Hemmwirkung < 2 % Restaktivität wurden die beiden wirksamsten Verbindungen **154** und **153** sowie die schwächer wirksame Referenzverbindung **1** zusätzlich bei einer 10-fach niedrigeren Inhibitorkonzentration von 1 μ M untersucht. Bei den Diastereomerenpaaren **155/159** und **156/157**, welche (siehe 5.4.2.4) unter Verwendung racemischer P3-P4-Bausteine wurde dem jeweils stärker hemmenden Inhibitor die D-Konfiguration in P3 zugeordnet.

Tabelle 21: Modifizierung der P3-Position. Die Restaktivitäten des KLK7 wurden mit einer Inhibitorkonzentration von 10 μ M in Gegenwart von 70 μ M des Substrats **119** bestimmt. Die Verbindungen **154**, **153** und **1** wurden zusätzlich mit einer reduzierten Inhibitorkonzentration von 1 μ M untersucht.



Nr.	P3	Restaktivität in % (10 μ M Inhibitor)	Restaktivität in % (1 μ M Inhibitor)
154		0,1	5,1
153		1,4	16,2
155		2,3	n.b.
156		2,4	n.b.
1		8,0	41,7
128		11,2	n.b.

137		20,6	n.b.
157		22,1	n.b.
131		30,3	n.b.
132		41,3	n.b.
158		44,4	n.b.
159		63,9	n.b.
134		65,3	n.b.

Als bester Inhibitor innerhalb dieser Inhibitorserie erwies sich Verbindung **154** mit D-hTyr in Position P3, der bereits als sehr günstiger P3-Rest für Matriptase^[166] und Faktor Xa^[68] identifiziert wurde. Abbildung 61 zeigt den modellierten Bindungsmodus des Inhibitors **154** in KLK7. B

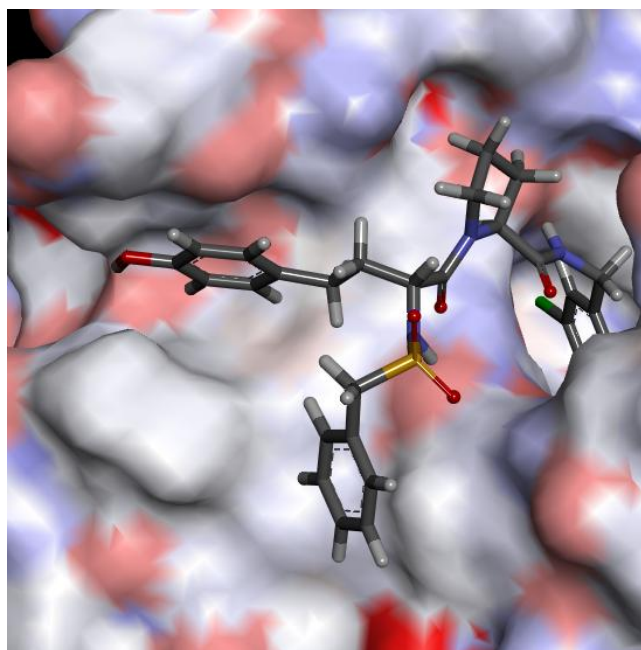


Abbildung 56: Modellierter Komplex des Inhibitors **154** (Kohlenstoff in grau, Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Schwefel gelb, Chlor grün) im aktiven Zentrum des KLK7 (dargestellt mit seiner Oberfläche, eingefärbt nach Atomtypen).

Das in Abbildung 56 gezeigte Modell wurde auf folgende Weise erstellt. Die Struktur des Inhibitors **154** wurde mit dem Programm MOE (Version 2014.9, 32 bit, Chemical Computing Group, Montreal, Kanada) erstellt und energieoptimiert. Anschließend wurde die Struktur mittels LeadIT (Version 2.1.8, *BioSolveIT GmbH*, Sankt Augustin, Deutschland) in das aktive Zentrum des KLK7 (PDB: 2QXI) gedockt. Die erhaltenen Dockinglösungen wurden manuell geprüft. Die sinnvollste Lösung wurde exportiert und die Abbildung 56 mit der Software Discovery Studio Visualizer (Version 4.5.0.15071, Dassault Sytemes, Vélizy-Villacoublay, Frankreich) erstellt. Für das Docking wurde festgelegt, dass die Carbonyl-Sauerstoffe von Ser214 und Gly216 als Wasserstoffbrückenakzeptoren und der Amid-Stickstoff des Gly216 als Wasserstoffbrückendonator fungieren soll. Diese Wechselwirkungen existieren in fast allen Komplexen der Serinproteasen der S1 Familie mit substratanalogen Hemmstoffen, und mit diesen Einschränkungen liefert das Docking sinnvollere Ergebnisse. Darüber hinaus wurde festgelegt, dass das Chloratom am P1-Rest des Inhibitors auf den aromatischen Ring von Tyr228 gerichtet sein soll. Die durch diese Prozedur erhaltenen Wechselwirkungen des KLK7 in Komplex mit Inhibitor **154** sind in Abbildung 57 dargestellt.

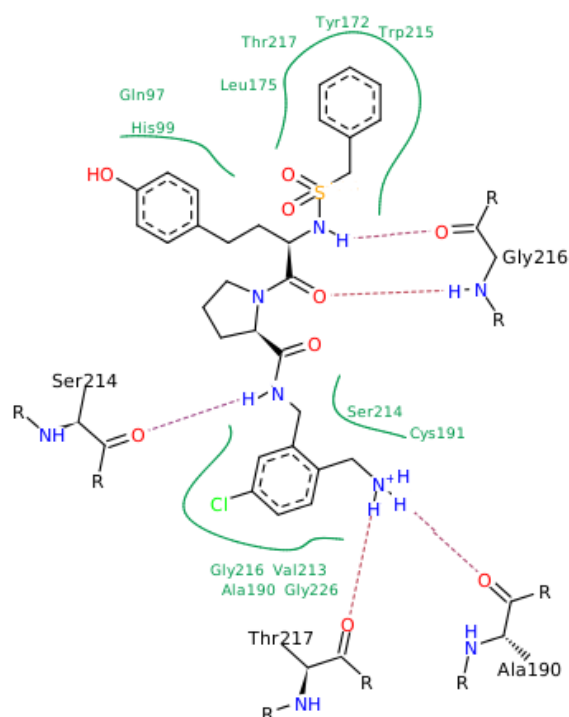


Abbildung 57: Mittels Docking bestimmter Bindungsmodus des Inhibitors **154** im aktiven Zentrum des KLK7. Polare Wechselwirkungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt, charakteristische Bindetaschen mit den entsprechenden Resten des KLK7 sind grün markiert.

Möglicherweise kann die Hydroxylgruppe an der Seitenkette des D-hTyr polare Wechselwirkungen zu Carbonylen in der S3/4-Tasche des KLK7 ausbilden, wie es für die Struktur des Inhibitors H-D-hTyr-Ala-4-Amba im Komplex mit Trypsin gezeigt wurde^[166]. Diese zusätzlichen Wechselwirkungen könnten die etwas stärkere Hemmwirkung des Inhibitors **154** im Vergleich zur D-hPhe-Verbindung **153** erklären.

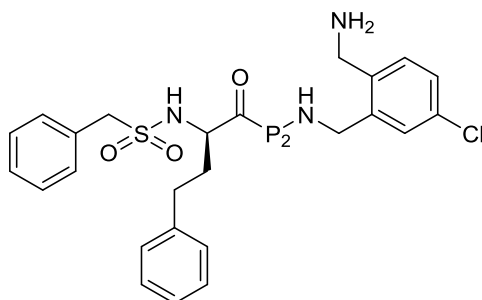
3.2.5 Untersuchungen zur Position P2

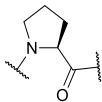
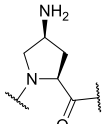
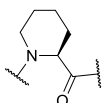
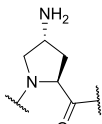
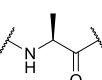
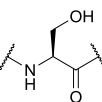
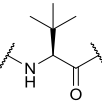
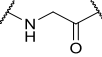
Wie im Falle der Urokinase ist die P2-Bindungstasche in ihrer Größe primär durch His99 begrenzt, was dazu führt, dass eher kleine hydrophobe Reste in P2-Position bevorzugt werden^[91]. Die bislang untersuchten Hemmstoffe besaßen alle ein Prolin in P2-Position, da dieser rigide Aminosäurerest für substratanaloge Hemmstoffe vieler trypsinartiger Serinproteasen besonders günstig ist. Andererseits ist das auch ein Nachteil, da man mit Prolin in P2-Position die Selektivität der Verbindungen wenig beeinflussen kann. In einer weiteren Inhibitorserie sollte geprüft werden, ob auch andere Reste für diese Position geeignet sind.

Sofern die Verbindungen nicht im Arbeitskreis verfügbar waren, erfolgte die Synthese wie in Abbildung 55 zuvor für die Verbindung **153** beschrieben. Hierbei startete die Synthese mit den unterschiedlichen Fmoc-geschützten P2-Resten. Zur Synthese des Serin-Derivates **160** wurde mit Fmoc-Ser(tBu)-OH und im Falle der Pro(NH₂)-Verbindungen **161** und **162** mit kommerziell erhältlichem Fmoc-Pro(4-S-Boc-NH)-OH bzw. Fmoc-Pro(4-RBoc-NH)-OH begonnen.

Auch für diese Hemmstoffe wurde die KLK7-Restaktivität bei einer Inhibitorkonzentration von 10 µM bestimmt (siehe 5.2.4.2), die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 22 gezeigt.

Tabelle 22: Modifizierung der P2-Position. Die Restaktivitäten des KLK7 wurden mit einer Inhibitorkonzentration von 10 μ M in Gegenwart von 50 μ M des Substrats **119** bestimmt.



Nr.	P2	Restaktivität in %
153		1,4
161		2,0
163		7,8
162		10,3
164		17,1
160		20,4
165		47,4
166		60,9

Als günstigster P2-Rest erwies sich das bereits zuvor immer genutzte Prolin. Eine relativ starke Hemmwirkung wurde nur noch für das Pro(4S-NH₂)-Derivat **161** gefunden. Die Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass die zyklischen und daher rigideren Iminosäuren als P2-Reste besser als normale Aminosäuren geeignet sind.

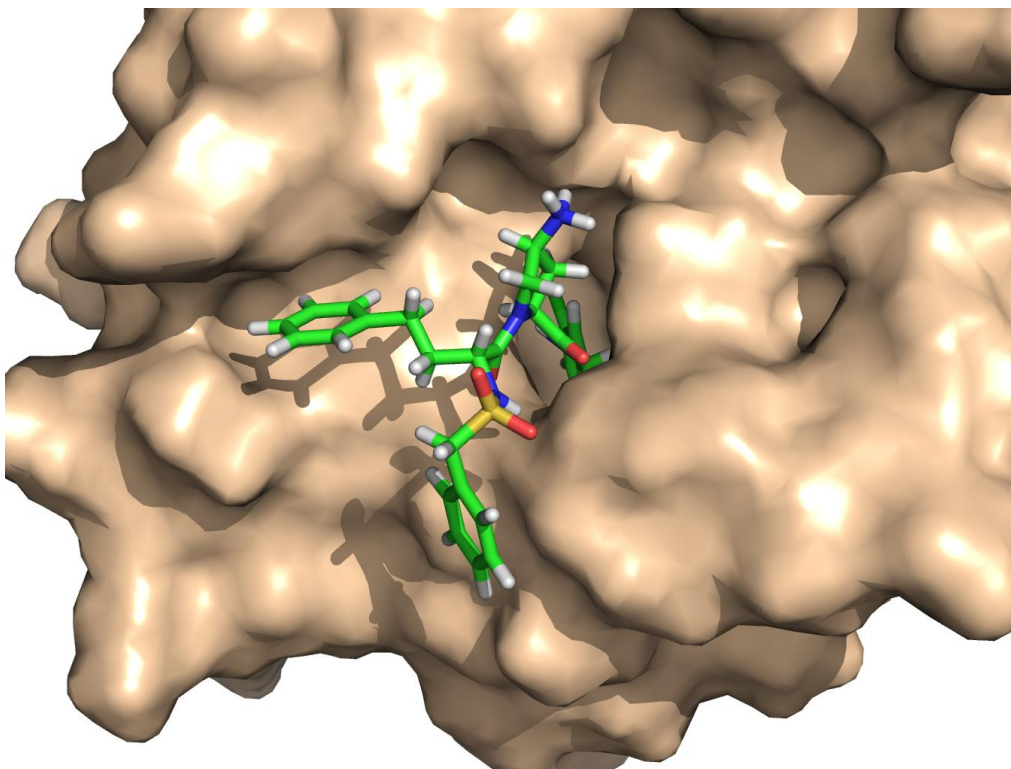


Abbildung 58: Modellierter Komplex des Inhibitors **161** (Kohlenstoffatome grün, Wasserstoff weiß, Stickstoff blau und Sauerstoff rot) im aktiven Zentrum des KLK7 (Oberfläche in hellbraun, PDB: 2QXI). Der Inhibitor **161** wurde mittels LeadIT in das aktive Zentrum des KLK7 gedockt.

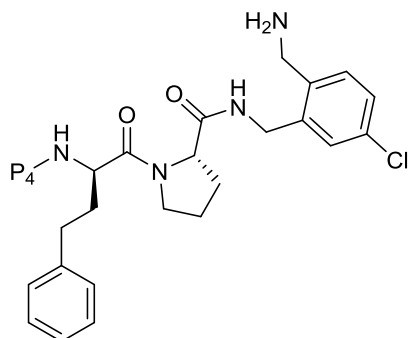
Es ist in Abbildung 58 zu erkennen, dass die Aminofunktion des Pro(S-4-NH₂) von der Bindetasche weg nach außen zeigt und daher sterisch nicht mit der Enzymoberfläche kollidiert. Dies könnte die erhöhte Affinität des Inhibitors **161** im Vergleich zum Analogon **162** erklären. Möglicherweise führt der Einbau des Pro(R-4-NH₂) zu einem sterischen Konflikt, wodurch die KLK7-Hemmung abgeschwächt wird. Aufgrund dieser Unterschiede wurde geschlussfolgert, dass die eher ins Lösungsmittel ragende Aminofunktion des Pro(4S-NH₂) des Inhibitors **161** weiter modifiziert werden kann, um die Selektivität der Verbindungen zu verbessern. Diese Arbeiten werden später im Abschnitt 3.2.7 beschrieben.

3.2.6 Modifizierung der P4-Position

Bei den zuvor beschriebenen Hemmstoffen wurde immer der Benzylsulfonylrest in P4-Position eingebaut, der sich bei vielen substratanalogen Hemmstoffen trypsinartiger Serinproteasen als besonders geeignet erwiesen hatte. Zur Modifizierung der P4-Position wurde das D-hPhe-Pro-AMCB P3-P1-Segment konstant gehalten und nur die N-terminale Gruppe ausgetauscht.

All diese Verbindungen wurden wie zuvor für das Benzylsulfonyl-Derivat **153** in Abbildung 55 unter Verwendung der unterschiedlichen Sulfonylchloride hergestellt und wieder die Restaktivität bei einer Inhibitorkonzentration von 1 µM bestimmt (Tabelle 23).

Tabelle 23: Modifizierung der P4-Position. Die Restaktivitäten wurden bei einer Inhibitorkonzentration von 1 μ M mit dem Substrat **119** (50 μ M im Ansatz) bestimmt.



Nr.	P4	Restaktivität in %
167		12,9
153		16,2
168		19,7
169		27,1
170		33,4
171		34,4
172		35,4
173		35,5
174		36,7
175		45,6
176		52,6
177		55,1
178		67,0

Die Verbindungen **153** und **167** erwiesen sich als die wirksamsten Hemmstoffe dieser Inhibitorserie. Auf Grund der geringen Wirkungsunterschiede und der leichteren Verfügbarkeit des unsubstituierten Benzylsulfonylchlorids im Vergleich zum 4-Cyano-Benzylsulfonylchlorid wurden keine weiteren Hemmstoffe mit dem 4-Cyano-Benzylsulfonylrest hergestellt.

3.2.7 Selektivität der Verbindungen

Der wirksamste P1-Rest, das 2-Aminomethyl-5-Chlor-Benzylamin war aus der Entwicklung von Thrombin- und FXa-Hemmstoffen bekannt. Man wusste auch, das Prolin in P2-Position, D-konfigurierte Homophenylalanin-Derivate in P3-Position und N-terminale Benzylsulfonylreste für substratanaloge Thrombin- und FXa-Inhibitoren geeignet sind.

Daher war zu vermuten, dass Verbindungen wie die Hemmstoffe **153**, **154** und **161** sehr wahrscheinlich Thrombin und FXa deutlich stärker als KLK7 hemmen. Das wurde in enzymkinetischen Messungen bestätigt (Tabelle 24).

Tabelle 24: Vergleich der Hemmung von KLK7, Thrombin und FXa durch die Inhibitoren **153**, **154** und **161**.

No	K_i (μM)		
	KLK7 ^a	Thrombin ^b	FXa ^a
153	2,78E-01	5,47E-04	4,06E-02
154	5,90E-02	6,02E-04	2,04E-02
161	1,62E-01	3,18E-04	5,60E-03

^aBestimmung des K_i -Wertes aus IC_{50} -Werten mittels der Cheng-Prussoff-Gleichung (siehe Kapitel 5.2)

^bBestimmung des K_i -Wertes aus Dixon-Plots^[182]

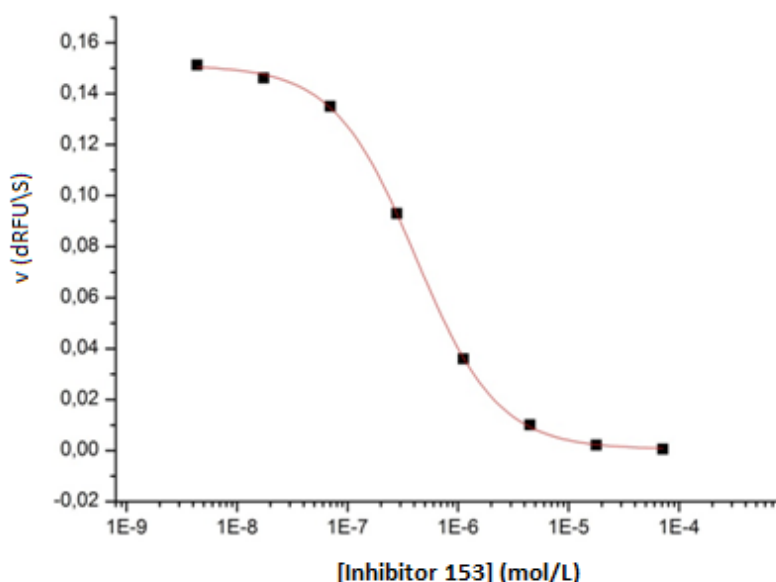


Abbildung 59: Auftragung der KLK7-Aktivität als Funktion der Konzentration des Inhibitors 153 zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes

Wie aus Tabelle 24 ersichtlich, hemmen die Verbindungen **153**, **154** und **161** vor allem Thrombin aber auch FXa deutlich stärker als KLK7. Demzufolge könnte die Verwendung dieser Verbindungen zu Blutungskomplikationen führen, wenn sie intravenös verabreicht werden. Eventuell könnte jedoch eine topische Applikation zur Behandlung von Hauterkrankungen möglich sein, da man davon ausgehen kann, dass die Wirkstoffe bei dieser Anwendung die Zirkulation kaum erreichen. Dennoch wäre es wünschenswert, die Hemmwirkung auf die Gerinnungsproteasen Thrombin und FXa abzuschwächen.

Um eine reduzierte Thrombinhemmung zu erhalten, sollte ein sterischer Konflikt mit dem Thrombin-spezifischen 60er-Loop induziert werden^[183]. Dieser Loop ist im Falle des Thrombins (Abbildung 60b) über der S2-Tasche platziert und wird im Wesentlichen von den insertierten Resten Tyr60A-Pro60B-Pro60C-Trp60D ausgebildet. Dieser Loop ist in KLK7 nicht vorhanden (Abbildung 60a), sodass diese Bindetasche relativ frei zugänglich ist.

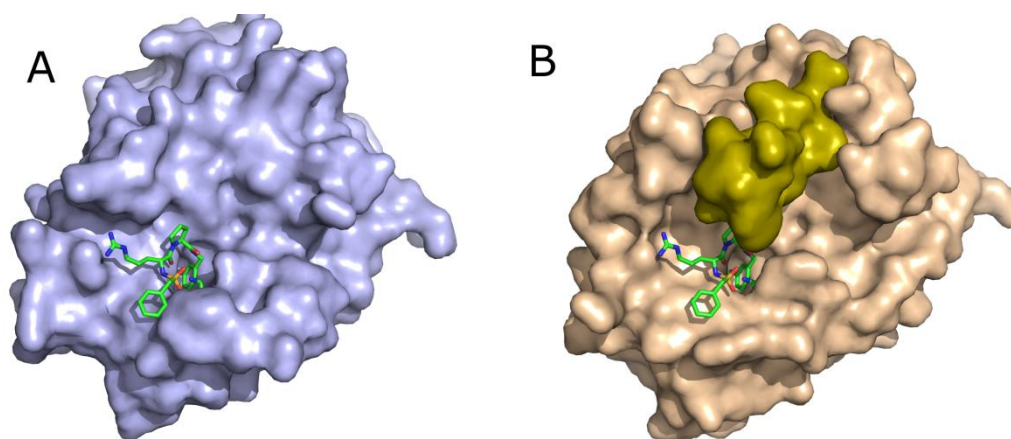


Abbildung 60: Modellierter Komplex des Inhibitors Bzsl-D-Arg-Pro-4-AMCB (**1**) (Kohlenstoffe in grün, Stickstoff in blau, Sauerstoff rot und Schwefel gelb) in (A) KLK7 (PDB: 2GV6, mit violetter Oberfläche) und (B) Kristallstruktur im Komplex mit Thrombin (PDB: 3EQ0, mit hellbrauner Oberfläche). Im Falle des Thrombins liegt der sogenannte 60er-Loop (oliv) direkt über der S2-Bindetasche und schränkt den Zugang zum aktiven Zentrum ein.

Wie bereits in Abbildung 58 gezeigt, ist die Aminofunktion des Pro(S-4-NH₂) in Position P2 des Inhibitors **161** vermutlich nach außen ins Lösungsmittel gerichtet. Die Acylierung der Aminogruppe sollte daher im Falle des KLK7 akzeptiert werden, während es zu einem sterischen Konflikt mit dem 60er-Loop des Thrombins kommen könnte. Es wurden daher Verbindungen (Tabelle 25) synthetisiert, bei denen diese Aminofunktion acyliert wurde, um die Thrombinhemmung zu reduzieren.

Die untersuchten Verbindungen wurden nach der folgenden Strategie zur Synthese der Verbindung **184** (Abbildung 61) hergestellt. Die anderen Hemmstoffe wurden auf analoge Weise erhalten.

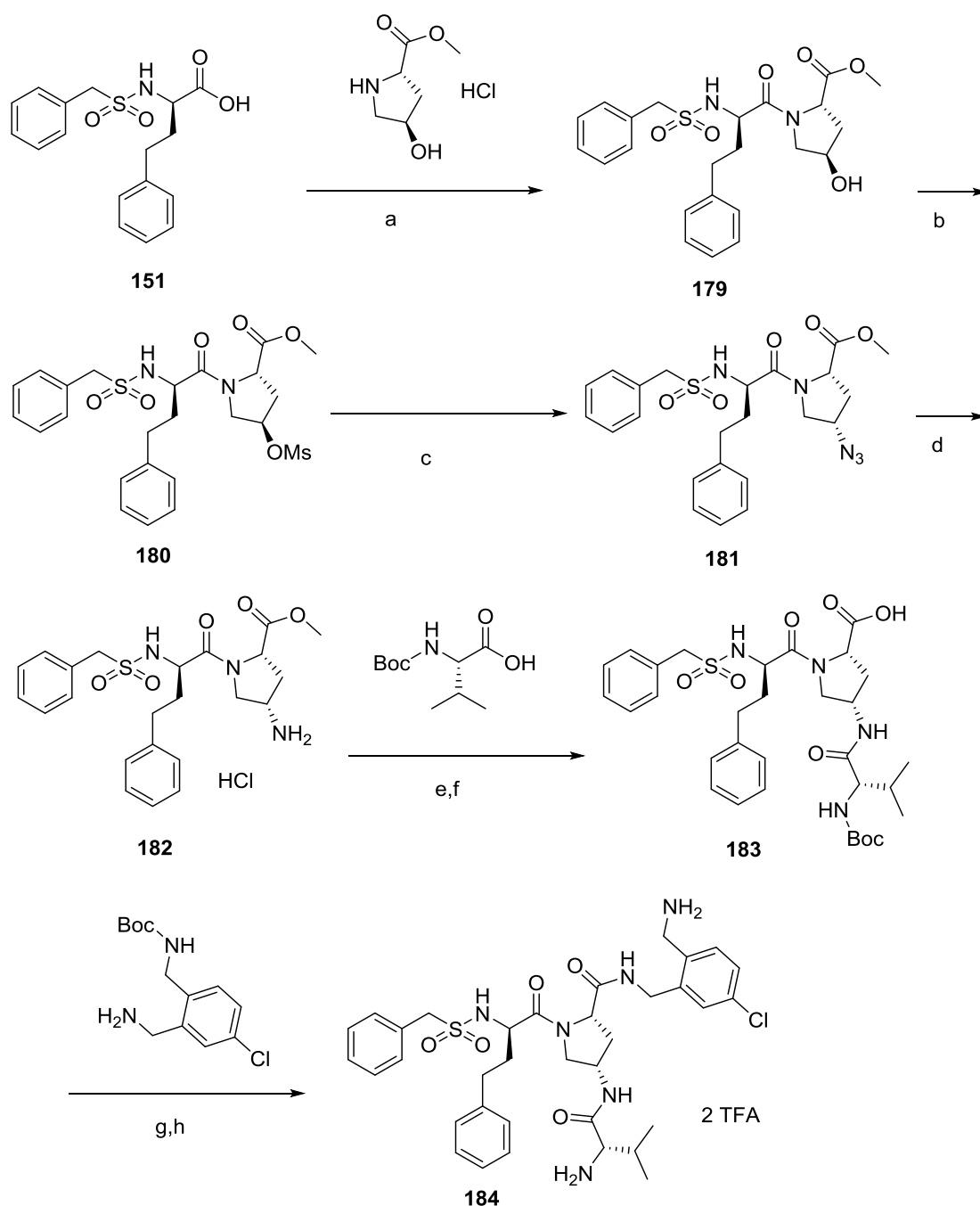
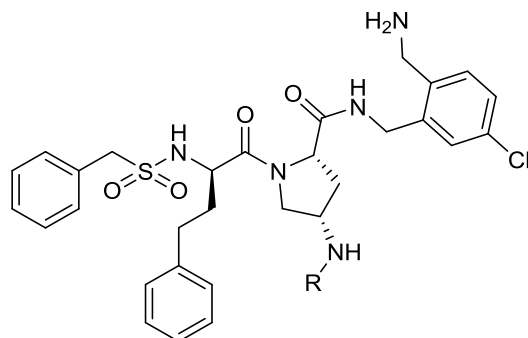


Abbildung 61: Synthese des Inhibitors **184**, Reaktionsbedingungen und Reagenzien. (a) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (b) Mes-Cl, N(Et)₃, DCM, RT. (c) NaN₃, DMSO, 90°C. (d) MeOH, Pd/C, H₂, RT. (e) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (f) 1 N NaOH, Dioxan. (g) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (h) TFA, 1h, RT, präparative HPLC.

Zunächst wurde 1 Äquiv. Bzls-D-hPhe-OH (**151**) mit H-Pro(R-4-OH)-OMe × HCl gekuppelt, wobei das Dipeptid **179** erhalten wurde. Verbindung **179** wurde an ihrer Hydroxylfunktion mesyliert, das Intermediat **180** wurde mit Natriumazid zu Bzls-D-hPhe-Pro(4S-N₃)-OMe (**181**) umgesetzt. Durch Hydrierung mittels H₂ bei Normaldruck wurde Verbindung **182** erhalten. An diese Verbindung wurde Boc-Val-OH gekuppelt. Die Verseifung des Methylesters ergab Intermediat **183**, das mit Boc-geschütztem AMCB gekuppelt und abschließend entschützt wurde (Abbildung 61).

Für die erhaltenen Inhibitoren wurde die KLK7-Restaktivität bestimmt, die Inhibitorkonzentration im Messansatz betrug 1 μM (siehe 5.2.4.2). Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 25 gezeigt.

Tabelle 25: KLK7 Hemmung durch acylierte 4-Aminoprolinderivate. Die Restaktivitäten wurden bei einer Inhibitorkonzentration von 1 μM mit dem Substrat **119** (50 μM im Ansatz) bestimmt. Der unacylierte Inhibitor **161** ist als Vergleich angegeben.



Nr.	R	Restaktivität in %
184		14,7
185		21,3
186		21,7
161		24,7
187		27,9
188		28,2
189		30,6
190		34,4
191		42,2
192		65,4

Die stärkste Hemmwirkung dieser Serie wurde für Inhibitor **184** bestimmt, dessen Aminofunktion am Pro(4S-NH₂)-Baustein mit Valin acyliert ist. Das analoge D-Val-Derivat **192** hat sich als deutlich weniger aktiv erwiesen.

Tabelle 26: Vergleich der KLK7-Hemmung durch die Inhibitoren **153**, **161** und **184**.

No	K _i (μM)		
	KLK7 ^a	Thrombin ^b	FXa ^a
153	2,78E-01	5,47E-04	4,06E-02
161	1,62E-01	3,18E-04	5,60E-03
184	2,96E-01	1,10E-02	1,25E-02

^aBestimmung des K_i-Wertes aus IC₅₀-Werten.

^bBestimmung des K_i-Wertes aus Dixon-Plots.^[182]

Durch die sterisch anspruchsvolle Modifikation des P2-Restes konnte die Hemmwirkung der Verbindung **184** (Tabelle 26) auf Thrombin um den Faktor 20 (**153** vs. **184**) erniedrigt werden, dagegen blieb die Inhibierung des KLK7 nahezu unverändert. Jedoch wurde FXa sogar etwas stärker inhibiert, demzufolge konnte nur die Selektivität gegenüber Thrombin verbessert werden. Das an seiner Aminofunktion unsubstituierte **161** hemmt KLK7 etwas stärker als **184**, ist jedoch deutlich unselektiver.

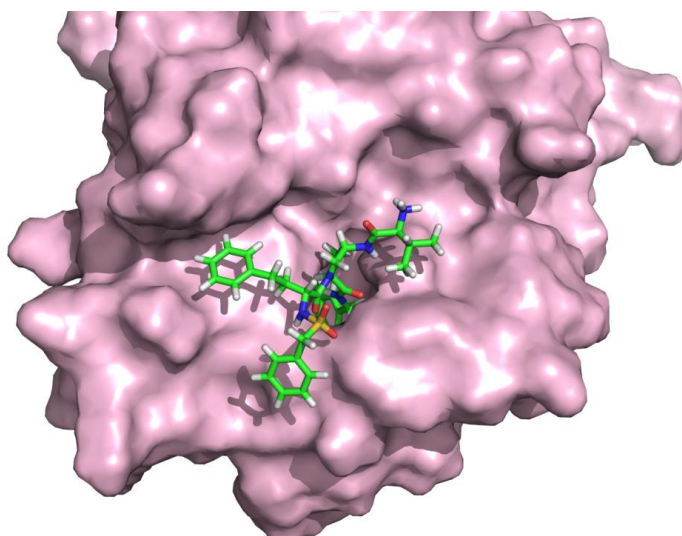


Abbildung 62: Mittels LeadIT gedockter Komplex des Inhibitors **184** (Kohlenstoffe in grün, Wasserstoffe weiß, Stickstoffe blau, Sauerstoffe rot und Schwefel ocker) im aktiven Zentrum des KLK7 (Oberfläche in rosa).

Abbildung 62 zeigt die modellierte Lage des Inhibitors **184** im aktiven Zentrum des KLK7. Das an den P2-Rest gekuppelte Valin ragt aus der Bindetasche heraus ins Lösungsmittel. Daher bleibt die Hemmwirkung auf KLK7 nahezu unverändert. Im Gegensatz dazu sollte der Valinrest mit dem 60er-Loop des Thrombins sterisch kollidieren, daher nimmt die Hemmwirkung auf Thrombin deutlich ab.

Zur Erstellung von Abbildung 62 wurde der Inhibitor **184** mit dem Programm MOE energieoptimiert und im Anschluss daran mittels LeadIT in das aktive Zentrum des KLK7 gedockt. Um die Qualität der Dockinglösungen zu verbessern, wurden mehrere Bedingungen vorgegeben. Die Rückgrat-Carbonyl-Sauerstoffe des Ser214 und des Gly216 sollten beide ein

Wasserstoffbrückenakzeptor sein und das Amid-NH des Gly216 als Wasserstoffbrückendonator fungieren. Es wurde zusätzlich festgelegt, dass das Chloratom am P1-Rest des Inhibitors über dem aromatischen Ring des Tyr228 platziert sein soll.

Da bei den Verbindungen mit Pro in P2-Position festgestellt wurde, dass die Hemmwirkung durch Ersatz des D-hPhe in **153** durch D-hTyr ca. dreifach stärker wird, wurde auch das D-hTyr-Derivat (**198**) des Hemmstoffs **184** synthetisiert (Abbildung 63).

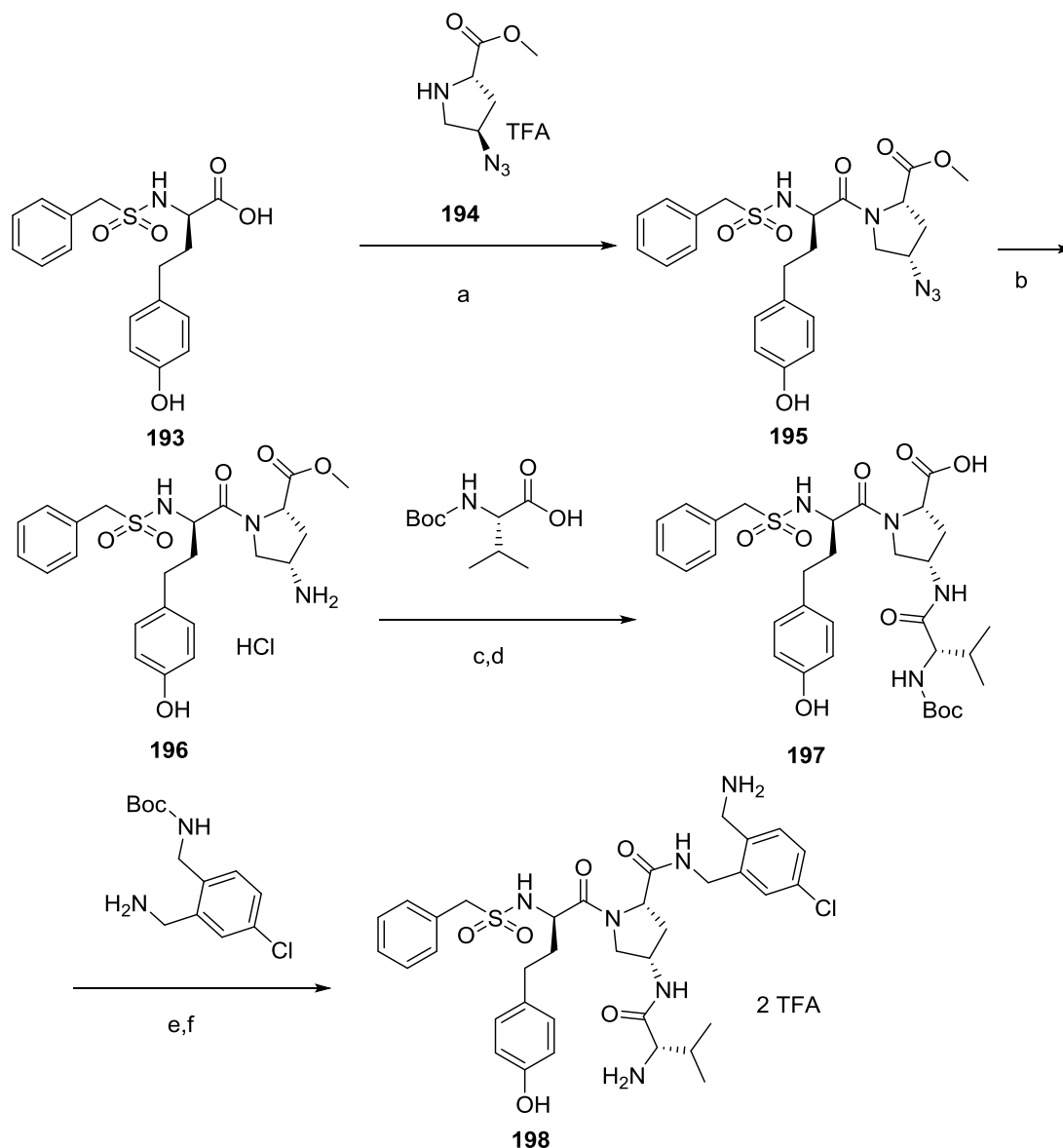


Abbildung 63: Synthese des Inhibitors **198**, Reaktionsbedingungen und Reagenzien. (a) 1 Äquiv. Bop, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (b) MeOH, Pd/C, H₂, RT. (c) 1 Äquiv. Bop, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (d) 1 N NaOH, Dioxan. (e) 1 Äquiv. Bop, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (f) TFA, 1h, RT, präparative HPLC.

Die Synthese der Verbindung **198** (Abbildung 63) erfolgte mit einem in der Seitenkette ungeschützten D-h-Tyr weitestgehend analog der bereits beschriebenen Strategie für den D-hPhe-Inhibitor **184** (Abbildung 61). Jedoch wurde im Unterschied zur Synthese von **184**, zur Vermeidung einer Mesylierung an der OH-Gruppe des D-hTyr, die Kupplung (Abbildung 63 a) mit dem Azid-Derivat **194** des H-Pro(4R-OH)-OMe durchgeführt.

Durch den Austausch des P3-D-hPhe gegen P3-D-hTyr konnte die Restaktivität des KLK7 bei einer Inhibitorkonzentration von 1 μM im Messansatz um den Faktor 1,6 von 23,2 % auf 14,2 % gesenkt werden. Diese Tendenz wurde auch aus dem Vergleich der Hemmkonstanten ersichtlich. Die D-hTyr-Verbindung **198** mit einem K_i -Wert von 91 nM ist ca. dreifach stärker wirksam als der Inhibitor **184**. (Tabelle 27).

Tabelle 27: Vergleich der Hemmkonstanten der Hemmstoffe **184** und **198**.

No	K_i (μM)		
	KLK7 ^a	Thrombin ^b	FXa ^a
184	2,96E-01	1,10E-02	1,25E-02
198	9,06E-02	4,10E-02	9,60E-03

^aBerechnung des K_i -Wertes aus IC_{50} -Werten.

^bBestimmung des K_i -Wertes aus Dixon-Plots^[182].

Die Hemmwirkung auf Thrombin wurde durch den Einbau des D-hTyr-Bausteins etwas abgeschwächt, jedoch wurde FXa durch das Derivat **198** sogar stärker inhibiert. Diese Tendenz entspricht den Ergebnissen aus früheren Arbeiten zur Entwicklung substratanaloger FXa-Inhibitoren^[184-185].

Um die FXa-Hemmwirkung zu reduzieren, wurde zusätzlich der N-terminale Benzylsulfonylrest des Inhibitors **184** durch eine Ethylsulfonyl-Gruppe im Hemmstoff **199** ausgetauscht^[82]. Die Synthese des Inhibitors **199** erfolgte analog zur Synthese des Hemmstoffs **184** (Abbildung 61Abbildung 64).

Tabelle 28: KLK-7 Hemmung durch die Inhibitoren **184** und **199**.

No	KLK7	
	K_i (μM) ^a	Restaktivität KLK7 ^b
184	2,96E-01	23,15 %
199	6,35E-01	48,15 %

^aBerechnung der Hemmkonstanten aus IC_{50} -Werten.

^bBestimmung der Restaktivität bei einer Inhibitorkonzentration von 1 μM .

Da der Ethylsulfonyl-Hemmstoff **199** im Vergleich zum Benzylsulfonyl-Derivat **184** KLK7 schwächer hemmt (Tabelle 28), wurde auf weitere Selektivitätsmessungen verzichtet.

3.2.8 Synthese eines zyklischen Inhibitors

Von einigen Hemmstoffen verwandter Serinproteasen ist bekannt^[175, 186-188], dass durch geeignete Zyklisierung des Inhibitors eine erhöhte Affinität aufgrund der Fixierung einer bevorzugten Konformation erreicht werden kann. Ebenso waren in der Literatur^[165] bereits zyklische Hemmstoffe des KLK7 beschrieben. Es wurde daher abschließend der zyklische Hemmstoff **205** hergestellt, der als ein zyklisches Analogon der Verbindung **153** angesehen werden kann. Die Synthese ist in Abbildung 64 beschrieben. Im ersten Schritt wurde die Ausgangsverbindung **200** mit Bernsteinsäureanhydrid acyliert, anschließend die Nitrogruppe

reduziert und das Intermediat **202** zyklisiert. Nach Verseifung wurde der Boc-geschützte P1-Baustein gekuppelt und im letzten Schritt die Boc-Gruppe abgespalten.

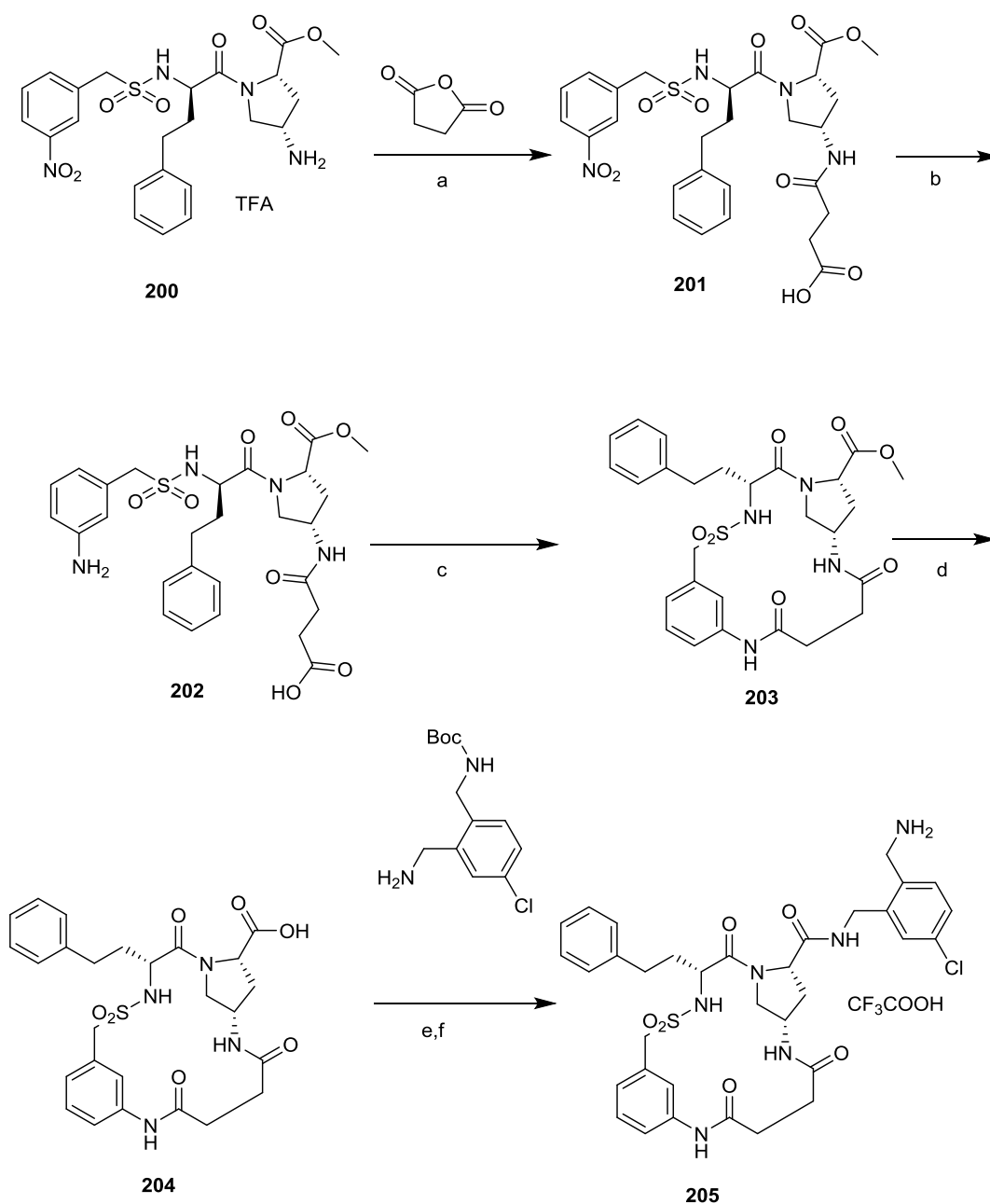


Abbildung 64: Synthese der zyklischen Verbindung **205**, Reaktionsbedingungen und Reagenzien. (a) 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (b) MeOH, Pd/C, H₂, RT. (c) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (d) 1 N NaOH, Dioxan. (e) 1 Äquiv. BOP, 2 Äquiv. DIPEA, DMF, RT. (f) TFA, 1h, RT, präparative HPLC.

Jedoch erwies sich der Inhibitor **205** als relativ schwach wirksamer KLK7-Hemmstoff (siehe 5.2.4.2). Bei einer Inhibitorkonzentration von 1 µM im Messansatz wurde eine Restaktivität von ca. 40 % bestimmt, bei dem nichtzyklisierten Kontrollinhibitor **153** eine Restaktivität von 21,3 %. Daher wurde auf weitere Untersuchungen des zyklischen Inhibitors **205** verzichtet.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Matriptase

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde, basierend auf früheren Arbeiten von Hammami, eine Reihe neuer substratanaloger Hemmstoffe der Matriptase hergestellt und deren Hemmwirkung auf Matriptase und die verwandten Serinproteasen Thrombin und Faktor Xa untersucht.

Die Matriptasehemmung der bereits bekannten Verbindung **50** ($K_i = 0,026 \mu\text{M}$) konnte durch keine der neu dargestellten substratanalogen Inhibitoren (Tabelle 14) verstärkt werden.

Matriptase bevorzugt in P3-Position D-konfigurierte Homophenylalanin-Derivate, nach bisherigem Kenntnisstand ist D-Homotyrosin der geeignetste Rest für diese Position.

Aufgrund der leichten synthetischen Zugänglichkeit von Homophenylalanin-Derivaten aus entsprechend substituierten Phenethylhalogeniden wurde eine Reihe von Hemmstoffen mit verschiedenen Derivaten des D-Homophenylalanins in Position P3 hergestellt. Die Hemmwirkung der bekannten Verbindung **50** wurde hierbei jedoch von keinem der Derivate erreicht.

Ausgehend von einer Kristallstruktur eines P3-D-hTyr-Inhibitors in Trypsin wurde der Komplex dieses Hemmstoffs im aktiven Zentrum der Matriptase modelliert. Wie vermutet, ragt die D-hTyr-Seitenkette sehr tief in die distale S3/4-Tasche der Matriptase. Die Überlagerung dieser Struktur mit einem Matriptasehemmstoff vom 3-Amidinophenylalanin-Typ mit einem N-terminalen halogensubstituierten Biphenyl-3-Sulfonylrest machte deutlich, dass die phenolische D-hTyr-Seitenkette etwas anders als der terminale Phenylring der Biphenyl-3-Sulfonylgruppe in dieser Bindetasche der Matriptase platziert ist. Diese Unterschiede im Bindungsmodus sind wahrscheinlich eine der Ursachen dafür, dass durch die Substitution der D-Homophenylalanin-Seitenkette mit Halogenen keine stärkere Matriptasehemmwirkung erreicht wurde.

Jedoch ist D-hTyr in P3-Position auch für Hemmstoffe anderer trypsinartiger Serinproteasen wie Faktor Xa ein besonders geeigneter P3-Rest, daher erfordert eine Selektivitätsverbesserung für Matriptase weitere Modifizierungen. Der Ersatz des P2-Prolins durch Alanin verbessert leicht die Matriptasehemmwirkung, reduziert jedoch drastisch die Thrombinhemmung. Die Eliminierung der P4-Benzylsulfonylgruppe bewirkt einen moderaten Affinitätsverlust auf Matriptase, reduziert jedoch sehr stark die FXa-Inhibierung. Relativ selektive Matriptasehemmstoffe erreicht man durch Einbau der Peptidsequenz Arg-Gln-Ala als P4-P2-Segment, die sich von der Autoaktivierungssequenz der Matriptase ableitet. Jedoch führt diese Sequenz auch zu einer leichten Abnahme der Matriptaseaffinität verglichen mit substratanalogen Hemmstoffen, die Derivate des D-Homophenylalanins in P3-Position enthalten.

Jedoch wurden zur Hemmung der Matriptase noch andere Inhibitortypen in den letzten Jahren beschrieben. Dazu gehören die bereits genannten Hemmstoffe des

3-Amidinophenylalanin-Typs^[13, 70, 72, 76, 189-190], peptidische Verbindungen mit Argininketon-Strukturen im P1-P'-Segment^[11, 191] oder verschiedenste nichtpeptidische Inhibitoren. Diese Verbindungen sind sicher alternative Ausgangsstrukturen für die Entwicklung noch aktiverer Matriptasehemmstoffe.

4.2 Kallikrein 7

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass erhöhte Aktivitäten des Kallikrein 7 Hauterkrankungen wie das Netherton-Syndrom und die Ausbreitung verschiedener Krebsarten verstärken können. Daher ist KLK7 ein potentielles Target für die Entwicklung neuer Wirkstoffe.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste substratanaloge Hemmstoffe des KLK7 entwickelt werden, die diese chymotrypsinartige Serinprotease im nanomolaren Bereich inhibieren.

Die Entwicklung startete mit einem Screening bereits vorhandener Verbindungen. Dabei wurde der Hemmstoff Bzls-D-Arg-Pro-AMCB (**1**) identifiziert, der KLK7 bereits im hohen nanomolaren Bereich mit einem K_i -Wert von 425 nM inhibiert. Jedoch ist diese Verbindung ein wesentlich stärkerer Hemmstoff der Blutgerinnungsproteasen Thrombin und FXa, wobei Thrombin ca. 1000- und FXa ungefähr 100-fach effektiver gehemmt werden. Durch den Austausch des P3-D-Arg durch D-hPhe wurde der Inhibitor **153** (Bzls-D-hPhe-Pro-AMCB) erhalten, der KLK7 bereits etwas stärker mit einem K_i -Wert von 278 nM inhibiert. Überraschenderweise bewirkt dieser Austausch eine reduzierte FXa-Hemmung, obwohl bei vergleichbaren Inhibitoren mit einem 4-Amidinobenzylamid in P1- und Glycin in P2-Position die Inhibitoren mit D-hPhe als P3-Rest bessere FXa-Hemmstoffe als die analogen D-Arg-Derivate waren. Eine weitere Verstärkung der KLK7-Hemmung bewirkte der Einbau von D-hTyr in P3-Position, der Inhibitor Bzls-D-hTyr-Pro-AMCB **154** ist mit einem K_i -Wert von 59,4 nM der stärkste Hemmstoff dieser substratanalogen Inhibitorserie. Jedoch ist diese Verbindung immer noch ein ca. 100-fach wirksamerer Thrombin- und ca. 3-fach stärkerer FXa-Inhibitor.

Um die sehr starke Thrombinhemmwirkung zu reduzieren, wurde das P2-Prolin substituiert. Es wurde vermutet, dass dies zu einem sterischen Konflikt mit dem thrombinspezifischen 60er-Loop oberhalb der S2-Tasche führen sollte. Dieser Loop fehlt im Falle des KLK7, daher sollte solch eine Modifizierung der Inhibitorstruktur bei KLK7 akzeptiert werden.

Durch den Einbau eines mit Valin in der Seitenkette acylierten Aminoprolins wurde der Inhibitor Bzls-D-hPhe-Pro(S-4-NH-Val)-AMCB (**184**) erhalten, der KLK7 ähnlich stark wie die D-hPhe-Verbindung **153** inhibiert, dessen Thrombinaffinität jedoch 20-fach reduziert wurde. Jedoch wird der Einbau sterisch anspruchsvoller P2-Reste vom FXa ebenfalls akzeptiert. Im Endeffekt ist der Inhibitor **184** im Vergleich zu KLK7 immer noch ein ca. 25-fach stärkerer Thrombin- und FXa-Hemmstoff. Wie erwartet, führte der Austausch des D-hPhe in Inhibitor **184** durch D-hTyr, welcher zu Verbindung **198** führte, zu einem stärkeren KLK7-Hemmstoff. Der Inhibitor Bzls-D-hTyr-Pro(S-4-NH-Val)-AMCB (**198**, K_i für KLK7 91 nM) hemmt Thrombin nur noch zweifach (K_i = 41 nM) und FXa noch 10-fach stärker. Auch wenn es im Falle dieser Entwicklungen bisher nicht gelungen ist eine Verbindung zu erhalten, die KLK7 stärker als

Thrombin und FXa inhibiert, sind die Inhibitoren dieses Typs erste nichtkovalent bindende Hemmstoffe dieser chymotrypsinartigen Serinprotease mit Hemmkonstanten im nanomolaren Bereich.

Der Bindungsmodus dieser Hemmstoffe im aktiven Zentrum des KLK7 wurde modelliert. Bis auf die Lage des N-terminalen Benzylsulfonylrestes nehmen die P3-P1-Reste ähnliche Positionen ein, wie sie von Komplexen des Thrombins mit substratanalogen Inhibitoren bekannt sind, die ebenfalls einen AMCB-Rest in P1-Position enthalten^[80]. Da KLK7 an der linken Flanke der S1-Tasche im Vergleich zu Thrombin einen zusätzlichen Rest besitzt (Phe218, in Thrombin fehlt der Rest in Position 218), gibt es bei KLK7 nicht diesen flachen Bindungsbereich oberhalb der Cys220-Cys191-Disulfidbrücke direkt neben der S1-Tasche, in die normalerweise bei vielen Thrombin- und FXa-Strukturen der N-terminale Benzylsulfonylrest bindet. Daher ist die Platzierung der Bzls-Gruppe im KLK7 anders als bei den bekannten Thrombin- und FXa-Strukturen.

Leider standen im Rahmen dieser Arbeiten zur Entwicklung der KLK7-Hemmstoffe nur begrenzte Mengen an Enzym zur Verfügung, wodurch eine genauere enzymkinetische Charakterisierung vieler Derivate nur eingeschränkt möglich war. Daher wurden für viele Derivate nur Restaktivitäten bei einer einzigen oder zwei Inhibitorkonzentrationen bestimmt und keine K_i -Werte. Dennoch sind aus den Restaktivitäten Rückschlüsse bezüglich der Unterschiede in den Hemmaktivitäten möglich, da die Messungen unter identischen Bedingungen erfolgten.

In zukünftigen Arbeiten sollte es möglich sein, diese ersten Leitstrukturen weiter zu optimieren, um die Hemmstärke und Selektivität der Verbindungen zu verbessern. Die Selektivitätsmessungen sollten noch auf weitere Serinproteasen der S1-Familie ausgeweitet werden und idealerweise der exakte Bindungsmodus der Verbindungen im aktiven Zentrum des KLK7 experimentell bestimmt werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Material

Die verwendeten Lösungsmittel und Standardchemikalien wurden von den Firmen Acros, Fisher Scientific, Fluka, Roth, Sigma-Aldrich oder VWR bezogen. Die Trocknung von Lösungsmitteln erfolgte durch Lagerung über geeignetem Molsieb oder, im Falle von THF, durch Lagerung und Destillation über Natrium.

Für die analytische und präparative HPLC wurde Acetonitril der Firmen VWR (HiPerSolv CHROMANORM) und Sigma-Aldrich (CHROMASOLV for HPLC) sowie Reinstwasser verwendet. Das Reinstwasser wurde mit einer NOWApure select Anlage (KSN Wassertechnik, Nistertal, Deutschland) hergestellt. Sämtliche wässrigen Lösungen von Säuren, Basen oder Salzen wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Trifluoressigsäure stammte aus Hochschullieferungen der Firma Solvay. Aminosäuren und deren Derivate sowie Kupplungsreagenzien stammten von den Firmen Bachem, Novabiochem, IRIS Biotech GmbH, Orpegen Peptide Chemicals und PolyPeptide.

5.1.2 HPLC-Messungen

Für alle analytischen und präparativen HPLC-Messungen wurden identische Laufmittel verwendet:

Laufmittel A (LM A): 0,1 % TFA in Wasser

Laufmittel B (LM B): 0,1 % TFA in ACN

Für die Herstellung des Laufmittels A wurde Reinstwasser verwendet.

5.1.2.1 Analytische HPLC

Sämtliche analytischen HPLC-Messungen wurden bei einer Flußrate von 1 mL/min mittels einer Shimadzu LC10A-Anlage (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland) bestehend aus folgenden Komponenten durchgeführt: Systemcontroller SCL-10AVP, Autoinjector SIL-10AXL, SPD-M10AVP Diodenarray-Detektor, 2 Pumpen LC-10ATVP und einem Säulenofen CTO-10A. Angaben zur Reinheit beziehen sich auf die Detektion bei 220 nm. Für die Messungen wurde eine C18-Säule (5 µM, 100 Å, 4,6 x 250 mm) der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) verwendet. Als Laufmittel wurde ein linearer Gradient aus LM A und LM B (Zunahme von 1 % LM B/min) verwendet, die Startbedingungen an LM B sind bei jeder Synthese angegeben.

5.1.2.2 Präparative HPLC

Die finalen Produkte wurden mittels einer präparativen HPLC-Anlage der Firma Varian (Pumpen: 2 x Prep Star 218, Detektor: Pro Star 320, Fraktionskollektor: Varian 701) mit einer

C18-Säule (5 μ M, 100 Å, 32 × 250 mm) der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) gereinigt (Flußrate 20 mL/min, Detektion bei 220 nm). Als Laufmittel wurde ein linearer Gradient aus LM A und LM B (Zunahme von 0,5 % LM B/min) verwendet.

Die jeweiligen Startbedingungen wurden anhand der analytischen HPLC-Trennungen gewählt.

5.1.3 Lyophilisierung

Einige Intermediate und sämtliche Inhibitoren und Substrate wurden nach ihrer Reinigung mittels präparativer HPLC aus 80 % *tert*-Butanol in Wasser oder aus Reinstwasser mit einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) lyophilisiert und in der Regel als TFA-Salze erhalten.

5.1.4 Massenspektrometrie

Die Bestimmung der molekularen Massen der dargestellten Verbindungen erfolgte im ESI(+)- oder ESI(-)-Modus mit einem QTrap 2000 ESI Massenspektrometer (Applied Biosystems) oder an einem AutoSpec-Gerät (Waters Corporation, Eschborn, Deutschland.)

5.1.5 NMR

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mittels eines Jeol-ECX-400 (Jeol Inc., USA) bei 400,0 bzw. 100,6 MHz aufgenommen und mittels des Lösungsmittelsignals oder durch Zugabe von $\text{TMS}^{[192]}$ referenziert, die chemischen Verschiebungen wurde in ppm angegeben. Die Auswertung der Spektren wurde mit der Software MestReNova durchgeführt.

Folgende Abkürzungen wurden benutzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, t = Triplett, m = Multiplett

5.1.6 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Fertigplatten „Kieselgel 60 F₂₅₄ I“ der Firma Merck und als Laufmittel ein Gemisch aus n-Butanol, Eisessig und Wasser (4:1:1) verwendet. Die Detektion der Verbindungen erfolgte bei 254 nm. Zusätzliche Anfärbereagenzien und ggf. andere Laufmittel sind bei den jeweiligen Synthesen angegeben.

5.2 Enzymkinetische Messungen

5.2.1 Matriptase

Die zu vermessenden Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, sodass 10 mM-Stammlösungen erhalten wurden, deren Lagerung bei -20 °C erfolgte. Die darauf folgenden Verdünnungsstufen wurden mittels Messpuffer (50 mM Tris, 154 mM NaCl, pH 8.0) durchgeführt.

Substrate wurden, wenn nicht anders angegeben, in Reinstwasser gelöst, sodass 10 mM-Stammlösungen erhalten wurden. Die darauf folgenden Verdünnungsstufen wurden ebenfalls mit Reinstwasser durchgeführt.

Enzymverdünnungen wurden mit Enzymverdünnungspuffer (154 mM NaCl mit 0.1 % BSA) hergestellt.

Die Fluoreszenzmessungen wurden bei Raumtemperatur in schwarzen FluoroNunc F96 MaxiSorp Platten (*Nunc*, Langenselbold, Deutschland) an einem Fluoreszenz-Plattenleser Fluoroskan Ascent (*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA) bei $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ durchgeführt. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe des Enzyms, die Dauer einer Messung betrug 10 Minuten. Aus der Änderung der Fluoreszenz über die Dauer der Messung wurden Anstiege bestimmt ($\Delta\text{Fluoreszenz}/\Delta t$). Die Ansatzgröße betrug 140 μL und setzte sich aus 100 μL Puffer bzw. Inhibitorlösung in Puffer, 20 μL Enzymlösung und 20 μL Substratlösung zusammen.

Die K_i -Werte wurden mittels eines bereits beschriebenen^[13] Assay bestimmt, die Konzentration der Matriptase im Ansatz betrug 23 pM. Als Substrat wurde Mes-D-Arg-Pro-Arg-AMC^[193] (**72**, K_M für Matriptase = 6 μM) mit Konzentrationen von 14, 7 und 3,5 μM im Ansatz verwendet. Die K_i -Werte wurden aus Dixon-Plots^[182] ermittelt und stellen den Mittelwert aus mindestens zwei Messungen dar.

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter von Substraten wurde der in Tabelle 29 gezeigte Messansatz verwendet.

Tabelle 29: Messansatz zur Bestimmung der kinetischen Parameter von Substraten der Matriptase.

Komponente	Volumen	c im Ansatz
Puffer	160 μL	entfällt
Substrat	20 μL	variiert
Enzym	20 μL	4,3 nM

Die Konzentrationen der Substrate im Ansatz betrugen 5, 10, 15, 25, 40, 60, 80 und 100 μM . Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in schwarzen FluoroNunc F96 MaxiSorp Platten (*Nunc*, Langenselbold, Deutschland) an einem Fluoreszenz-Plattenleser Fluoroskan Ascent (*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA) bei $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$

durchgeführt. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe des Enzyms, die Dauer einer Messung betrug 10 Minuten. Aus der Änderung der Fluoreszenz über die Dauer der Messung wurden Anstiege bestimmt ($\Delta\text{Fluoreszenz}/\Delta t$). Diese Anstiege wurden mittels Origin 8.1 (OriginLab Corporation, Northhampton, Massachusetts, USA) gegen die Substratkonzentration aufgetragen und hieraus K_m und V_{max} bestimmt.

5.2.2 Thrombin

Die zu vermessenden Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, sodass 10 mM Stammlösungen erhalten wurden, deren Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgte. Die darauf folgenden Verdünnungsstufen wurden mittels Messpuffer (50 mM Tris, 154 mM NaCl, pH 8.0) durchgeführt.

Das Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-AMC x TFA wurde in Reinstwasser gelöst, sodass eine 10 mM-Stammlösung erhalten wurde. Die darauf folgenden Verdünnungsstufen wurden ebenfalls mit Reinstwasser durchgeführt.

Enzymverdünnungen wurden mit Enzymverdünnungspuffer (154 mM NaCl mit 0,1 % BSA) hergestellt.

Die Fluoreszenzmessungen wurden bei Raumtemperatur in schwarzen FluoroNunc F96 MaxiSorp Platten (Nunc, Langensfeld, Deutschland) an einem Fluoreszenz-Plattenleser Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei $\lambda_{ex} = 355\text{ nm}$ und $\lambda_{em} = 460\text{ nm}$ durchgeführt. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe des Enzyms, die Dauer einer Messung betrug 10 Minuten. Aus der Änderung der Fluoreszenz über die Dauer der Messung wurden Anstiege bestimmt ($\Delta\text{Fluoreszenz}/\Delta t$). Die Ansatzgröße betrug 140 μL und setzte sich aus 100 μL Puffer bzw. Inhibitorlösung in Puffer, 20 μL Enzym-Lösung und 20 μL Substratlösung zusammen.

Die K_i -Werte wurden mittels eines bereits beschriebenen^[13] Assay bestimmt, die Konzentration des Thrombins im Ansatz betrug 31 pM. Als Substrat wurde Tos-Gly-Arg-Pro-AMC (K_M für Thrombin = 5,4 μM) mit Konzentrationen von 10, 5 und 2,5 μM im Ansatz verwendet. Die K_i -Werte wurden aus Dixon-Plots^[182] ermittelt und stellen den Mittelwert aus mindestens zwei Messungen dar.

5.2.3 Faktor Xa

Die zu vermessenden Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, sodass 10 mM-Stammlösungen erhalten wurden, deren Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgte. Die darauf folgenden Verdünnungsstufen wurden mittels Messpuffer (50 mM TRIS, 154 mM NaCl, pH 8.0) durchgeführt.

Das Substrat Mes-D-Arg-Pro-Arg-AMC^[193] wurde in Reinstwasser gelöst, sodass eine 10 mM-Stammlösung erhalten wurde. Die darauf folgenden Verdünnungsstufen wurden ebenfalls mit Reinstwasser durchgeführt.

Enzymverdünnungen wurden mit Enzymverdünnungspuffer (154 mM NaCl mit 0,1 % BSA) hergestellt.

Die Fluoreszenzmessungen wurden bei Raumtemperatur in schwarzen FluoroNunc F96 MaxiSorp Platten (*Nunc*, Langenselbold, Deutschland) an einem Fluoreszenz-Plattenleser Fluoroskan Ascent (*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA) bei $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ durchgeführt. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe des Enzyms, die Dauer einer Messung betrug 10 Minuten. Aus der Änderung der Fluoreszenz über die Dauer der Messung wurden Anstiege bestimmt ($\Delta\text{Fluoreszenz}/\Delta t$). Die Ansatzgröße betrug 140 μL und setzte sich aus 100 μL Puffer bzw. Inhibitorlösung in Puffer, 20 μL Enzym-Lösung und 20 μL Substratlösung zusammen.

Die K_i -Werte wurden mittels eines bereits beschriebenen Assays^[13] bestimmt, die Konzentration des Faktor Xa im Ansatz betrug 97 pM. Als Substrat wurde Mes-d-Arg-Pro-Arg-AMC^[193] (K_M für Faktor Xa = 28 μM) mit Konzentrationen von 50, 25 und 12,5 μM im Ansatz verwendet. Die K_i -Werte wurden aus Dixon-Plots^[182] ermittelt und stellen den Mittelwert aus mindestens zwei Messungen dar.

5.2.3.1 Berechnung der K_i -Werte aus IC_{50} -Bestimmungen

Sofern K_i -Werte über den IC_{50} -Wert bestimmt wurden, erfolgte dies nach dem folgenden, in Tabelle 30 beschriebenen Ansatz.

Tabelle 30: Messansatz zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes.

Komponente	Konzentration	Volumen	c im Ansatz
Inhibitor oder Puffer	---	120 μL	---
Mes-DArg-Pro-Arg-AMC (72)	350 μM	20 μL	50 μM
Enzym	6,8 E-10	20 μL	9,7 E-11 M

Die Messung erfolgte mit jeweils acht verschiedenen Inhibitorkonzentrationen in einem Bereich von $1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ bis $6,4 \times 10^{-11} \text{ M}$.

Die Fluoreszenzmessungen wurden bei Raumtemperatur in schwarzen FluoroNunc F96 MaxiSorp Platten (*Nunc*, Langenselbold, Deutschland) an einem Fluoreszenz-Plattenleser Fluoroskan Ascent (*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA) bei $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ durchgeführt. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe des Enzyms, die Dauer einer Messung betrug 10 Minuten. Aus der Änderung der Fluoreszenz über die Dauer der Messung wurden Anstiege bestimmt ($\Delta\text{Fluoreszenz}/\Delta t$). Daran anschließend wurden die Anstiege mittels Origin gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen und der IC_{50} -Wert bestimmt. Die Berechnung der K_i -Werte erfolgte nach Formel 1.

Formel 1: Bestimmung des K_i aus dem IC_{50} -Wert.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

[S] ist hierbei die Substratkonzentration im Messansatz, K_M ist die Michaelis-Menten-Konstante des verwendeten Substrates.

5.2.4 Kallikrein 7

Die zu vermessenden Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, sodass 10 mM-Lösungen erhalten wurden, deren Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgte. Die darauf folgenden Verdünnungsstufen wurden mittels KLK7-Puffer (0,1 M NaCl, 0,05 M TRIS, 0,005 % Tween 20, pH 8,0) durchgeführt.

Substrate wurden, wenn nicht anders angegeben, in Reinstwasser gelöst, sodass 10 mM-Stammlösungen erhalten wurden. Die darauf folgenden Verdünnungsstufen wurden ebenfalls mit Reinstwasser durchgeführt.

Enzymverdünnungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit KLK7-Puffer (0,1 M NaCl, 0,05 M TRIS, 0,005 % Tween 20, pH 8,0) hergestellt.

Die Fluoreszenzmessungen wurden bei Raumtemperatur in schwarzen FluoroNunc F96 MaxiSorp Platten (*Nunc*, Langenselbold, Deutschland) an einem Fluoreszenz-Plattenleser Fluoroskan Ascent (*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA) bei $\lambda_{\text{ex}} = 355\text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 460\text{ nm}$ durchgeführt. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe des Enzyms, die Dauer einer Messung betrug 10 Minuten. Aus der Änderung der Fluoreszenz über die Dauer der Messung wurden Anstiege bestimmt ($\Delta\text{Fluoreszenz}/\Delta t$).

5.2.4.1 Untersuchung von Substraten

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter von Substraten wurde der in Tabelle 31 beschriebene Ansatz verwendet und mittels der voranstehenden Methode vermessen.

Tabelle 31: Messansatz zur Bestimmung der kinetischen Parameter von Substraten

Komponente	Konzentration	Volumen	c im Ansatz
Substrat oder Puffer	variiert	100 μL	variiert
Enzym	Unbekannt ^c	20 μL	Unbekannt ^a

^a Für das erhaltene Enzym waren keine Angaben zur Konzentration verfügbar. Eine active-site-Titration wurde nicht durchgeführt.

Es wurden jeweils mehrere Substratkonzentrationen vermessen (bei den Messungen angegeben) und die jeweiligen Anstiege ($\Delta\text{Fluoreszenz}/\Delta t$) bestimmt. Die kinetischen Parameter wurden mittels Michaelis-Menten-Auftragung oder Lineweaver-Burke-Auftragung bestimmt.

5.2.4.2 Bestimmung von Restaktivitäten

Tabelle 32: Messansatz zur Bestimmung der Restaktivität von KLK7.

Komponente	Konzentration	Volumen	c im Ansatz
Inhibitor oder Puffer	Siehe Messung ^a	100 µL	Siehe Messung ^a
Mes-D-Arg-Pro-Tyr AMC (119) ^b	350 µM	20 µL	50 µM
Enzym	Unbekannt ^c	20 µL	Unbekannt ^c

^a Die Konzentration der vermessenen Inhibitoren im Ansatz ist bei der jeweiligen Messung angegeben

^b Sofern andere Substrate verwendet wurden, sind diese bei der jeweiligen Messung angegeben

^c Für das erhaltene Enzym waren keine Angaben zur Konzentration verfügbar. Eine active-site-Titration wurde nicht durchgeführt.

Die Bestimmung der Restaktivitäten erfolgte nach dem in Tabelle 32 gezeigten Ansatz. Die ermittelten Anstiege (siehe 5.2.4) von Puffer und Enzym wurden verglichen, der für den Puffer ermittelte Anstieg wurde gleich 100 % Restaktivität (ungehemmter Umsatz) gesetzt, die für die Inhibitoren ermittelten Werte wurden hierauf bezogen.

5.2.4.3 Bestimmung der K_i-Werte aus IC₅₀-Bestimmungen

Sofern K_i-Werte über den IC₅₀-Wert bestimmt wurden, erfolgte dies nach dem folgenden, in Tabelle 33 beschriebenen Ansatz.

Tabelle 33: Messansatz zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes

Komponente	Konzentration	Volumen	c im Ansatz
Inhibitor oder Puffer	---	120 µL	---
Mes-D-Arg-Pro-Tyr AMC (119)	350 µM	20 µL	50 µM
Enzym	Unbekannt ^a	20 µL	Unbekannt ^a

^a Für das erhaltene Enzym waren keine Angaben zur Konzentration verfügbar. Eine active-site-Titration wurde nicht durchgeführt

Die Messung erfolgte mit jeweils acht verschiedenen Inhibitorkonzentrationen, in einem Bereich von 1×10^{-4} M bis 6×10^{-9} M.

Die Fluoreszenzmessungen wurden bei Raumtemperatur in schwarzen FluoroNunc F96 MaxiSorp Platten (Nunc, Langenselbold, Deutschland) an einem Fluoreszenz-Plattenleser Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm durchgeführt. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe des Enzyms, die Dauer einer Messung betrug 10 Minuten. Aus der Änderung der Fluoreszenz über die Dauer der Messung wurden Anstiege bestimmt ($\Delta\text{Fluoreszenz}/\Delta t$). Daran anschließend wurden die Anstiege mittels Origin gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen und der IC₅₀-Wert bestimmt. Die Berechnung der K_i-Werte erfolgte nach Formel 1.

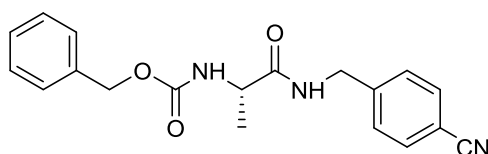
5.3 Synthese der Intermediate

Zum Waschen der Ansätze wurden in der Regel folgende Lösungen verwendet:

- saures Waschen mit 5 % KHSO_4 -Lösung
- neutrales Waschen mit gesättigter NaCl -Lösung
- basisches Waschen mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung

5.3.1 Synthese der Bausteine Ala-4-Amba und Pro-4-Amba

Cbz-Ala-(4-CN)benzylamid (206)



206

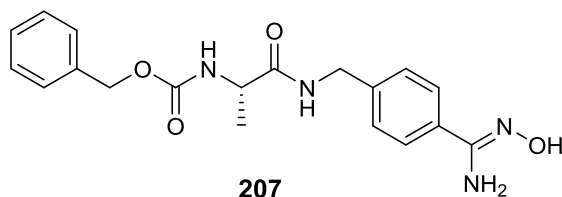
Exact Mass: 337,14

Molecular Weight: 337,38

8,46 g (37,93 mmol) Cbz-Ala-OH wurden in 60 mL trockenem THF mit 4,17 mL (37,93 mmol, 1.00 Äquiv.) NMM versetzt und auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Nach Zugabe von 4,93 mL (37,93 mmol, 1.00 Äquiv.) Chlorkohlensäureisobutylester wurde der Ansatz 10 min bei dieser Temperatur gerührt und anschließend mit 6,4 g (37,93 mmol, 1,00 Äquiv.) 4-Cyanobenzylamin \times HCl und 4,17 mL (37,93 mmol, 1.00 Äquiv.) NMM versetzt, weitere 60 min bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ und über Nacht bei RT gerührt. Der Ansatz wurde mit ca. 60 mL H_2O versetzt, das THF i.V. weitestgehend entfernt und die Lösung mit 150 mL 5 % KHSO_4 und 450 mL EtOAc versetzt. Der Ansatz wurde insgesamt 3 \times mit 5 % KHSO_4 , 1 \times mit NaCl-gesättigtem Wasser, 3 \times mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und 3 \times mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i.V. eingengt.

Ausbeute: 11,46 g (33,97 mmol; 89,6 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 34,6 min (Start bei 10 % LM B).

Cbz-Ala-(4-Hydroxyamidino)benzylamin (207) ^[194]



207

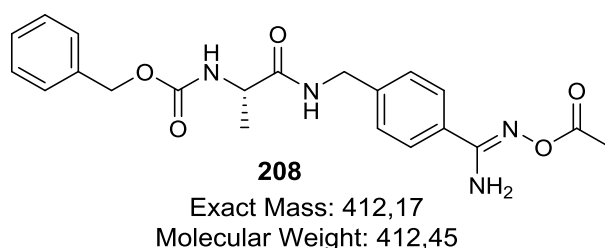
Exact Mass: 370,16

Molecular Weight: 370,41

7,66 g (22,72 mmol) Cbz-Ala-(4-CN)benzylamin (**206**) wurden in 300 mL trockenem Ethanol mit 3,16 g (45,44 mmol, 2.00 Äquiv.) Hydroxylamin \times HCl und 7,91 mL (45,44 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA versetzt, für 6 h unter Rückfluss gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der am Morgen gebildete weiße Feststoff wurde abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und i.V. getrocknet.

Ausbeute: 6,93 g (18,71 mmol; 82,4 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 18,5 min (Start bei 10 % LM B).

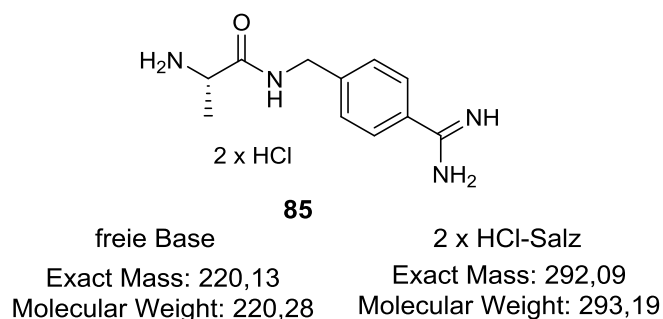
Cbz-Ala-(4-Acetylhydroxyamidin)benzylamin (**208**)^[195]



4,87 g (13,16 mmol) Cbz-Ala-(4-Hydroxyamidin)benzylamin (**207**) wurden in 35 mL ACN und 35 mL AcOH gelöst, mit 2,99 mL (31,58 mmol, 2.40 Äquiv.) Acetanhydrid versetzt, für 1 h bei RT gerührt und bei einer Badtemperatur von 30 °C i.V. weitestgehend eingengt. Der Rückstand wurde mit gesättigter NaCl-Lösung und EtOAc versetzt und geschüttelt. Dabei kam es zur spontanen Kristallisation des Produktes. Zur Vervollständigung der Kristallisation wurde der Scheidetrichter für 1 h im Eiswasser gelagert, der Feststoff danach abgesaugt und i.V. getrocknet.

Ausbeute: 2,99 g (7,25 mmol; 55,1 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 29,1 min (Start bei 10 % LM B).

H-Ala-(4-Amidin)benzylamin \times 2 HCl (**85**)^[196]



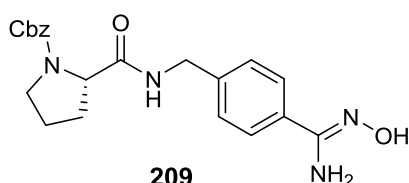
2,13 g (5,16 mmol) Cbz-Ala-(4-Acetylhydroxyamidino)benzylamin (**103**) wurden in 100 mL 90 % AcOH gelöst, mit 210 mg 10 % Pd auf Aktivkohle versetzt und mittels H_2 bei Normaldruck über Nacht hydriert (Reaktionskontrolle mittels DC mit n-Butanol/AcOH/ H_2O , 4/1/1 (v/v/v) als Laufmittel, R_f Edukt 0,70; R_f Produkt 0,13). Nach vollständigem Umsatz

wurde der Katalysator durch Filtration entfernt, der Ansatz eingengt und mit 20 mL 1N HCl und 40 mL H₂O versetzt. Der Ansatz wurde wieder i.V. eingengt, in Wasser gelöst und das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 779 mg (2,66 mmol; 51,6 % der Theorie), weißer Feststoff als 2 × HCl-Salz, HPLC 9,7 min (Start bei 1 % LM B).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 1.39 ppm (d, J = 7.20 Hz, 3H), 3.91 ppm (s, 1H), 4.45 ppm (d, J = 6.00 Hz, 2H), 7.49 ppm (d, J = 8.00 Hz, 2H), 7.79 ppm (d, J = 8.00 Hz, 2H), 8.10 ppm (s, 3H), 8,98 ppm (t, J = 6.00 Hz, 1H), 9,26 ppm (s, 1H).

Cbz-Pro-(4-Hydroxyamidin)benzylamin^[169] (209)



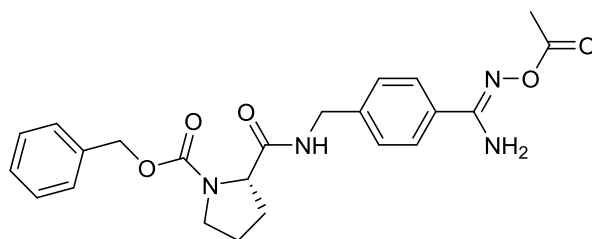
209

Exact Mass: 396,18
Molecular Weight: 396,45

8,00 g (22,01 mmol) Cbz-Pro-(4-CN)benzylamin, verfügbar von früheren Arbeiten^[169], wurden in 160 mL Ethanol mit 3,04 g (44,02 mmol, 2.00 Äquiv.) Hydroxylamin × HCl und 7,66 mL (44,02 mmol, 2,00 Äquiv) DIPEA versetzt, für 8h unter Rückfluss gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der am Morgen vorliegende weiße Feststoff wurde abgesaugt und i.V. getrocknet.

Ausbeute: 6,66 g (16,80 mmol; 76,3 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 22,3 (Start bei 10 % LM B)

Cbz-Pro-(4-Acetylhydroxyamidin)benzylamin (210)^[169]



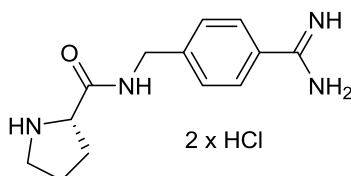
210

Exact Mass: 438,19
Molecular Weight: 438,48

6,09 g (15,35 mmol) Cbz-Pro-(4-Hydroxyamidin)benzylamin (**209**) wurden in 75 mL AcOH gelöst und mit 3,48 mL (36,84 mmol, 2.40 Äquiv.) Acetanhydrid versetzt. Die weitere Umsetzung erfolgte analog zur Darstellung der Verbindung **208**.

Ausbeute: 5,04 g (11,49 mmol; 74,9 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 19,1 min (Start bei 20 % LM B).

H-Pro-(4-Amidin)benzylamin × 2 HCl (88)^[169]



88

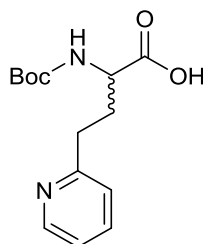
2 x HCl-Salz	freie Base
Exact Mass: 318,10	Exact Mass: 246,15
Molecular Weight: 319,23	Molecular Weight: 246,31

4,32 g (9,85 mmol) Cbz-Pro-(4-AcetylHydroxyamidin)benzylamin (**210**) wurden in 100 mL 90 % Essigsäure gelöst, mit ca. 400 mg 10 % Pd/C versetzt und bei Normaldruck mit Wasserstoff hydriert (Reaktionskontrolle mittels DC mit n-Butanol/AcOH/H₂O, 4/1/1 (v/v/v) als Laufmittel, R_f Edukt 0,71; R_f Produkt 0,17). Nach vollständigem Umsatz wurde der Katalysator durch Filtration entfernt, der Ansatz i.V. eingengt, mit 20 mL 1N HCl und 40 mL H₂O versetzt, erneut i.V. eingengt, in Wasser gelöst und das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 2,59 g (8,11 mmol; 82,3 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC = 11,4 min (Start bei 1 % LM B).

5.3.2 Synthese Boc-geschützter Aminosäuren

Boc-D/L-hAla(pyrid-2-yl)-OH (**211**)^[197]



211

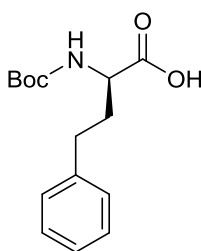
Exact Mass: 280,14

Molecular Weight: 280,32

1,00 g (5,55 mmol) H-D/L-hAla(pyrid-2-yl)-OH (verfügbar aus früheren Arbeiten^[68]) wurden in 15 mL einer Mischung aus Dioxan und Wasser (2/1) gelöst und mit 10 mL 1N NaOH und 1,52 g (6,96 mmol, 1.25 Äquiv.) Boc₂O versetzt. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde das Dioxan i.V. entfernt, der Ansatz mit 50 mL EtOAc versetzt und mit einer geringen Menge 5 % KHSO₄-Lösung (ca. 10 mL) und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel i.V. entfernt.

Ausbeute: 248 mg (0,88 mmol; 15,8 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 12,6 min (Start bei 10 % LM B).

Boc-D-hPhe-OH (**212**)^[197]



212

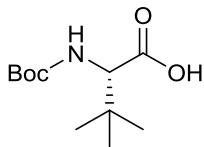
Exact Mass: 279,15

Molecular Weight: 279,34

2,19 g (12,22 mmol) H-D-hPhe-OH wurden in 70 mL Dioxan und 35 mL Wasser suspendiert, mit 14 mL 1 N NaOH versetzt, auf 0 °C gekühlt und mit 2,96 g (13,56 mmol; 1.11 Äquiv.) Boc₂O versetzt. Der Ansatz wurde bis zum nahezu vollständigen Umsatz (HPLC) bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte analog zur Darstellung von **211**.

Ausbeute: 2,63 g (9,42 mmol; 77,1 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 29,7 min (Start bei 20 % LM B).

Boc-Tle-OH (213)^[197]



213

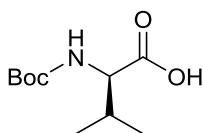
Exact Mass: 231,15

Molecular Weight: 231,29

307 mg (2,34 mmol) H-Tle-OH wurden in 7,5 mL einer Mischung aus Dioxan und Wasser (2/1) gelöst und mit 2,5 mL 1N NaOH und 1,02 g (4,68 mmol, 2.00 Äquiv.) Boc₂O versetzt. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde das Dioxan i.V. entfernt, der Ansatz mit 25 mL EtOAc versetzt, mit einer geringen Menge 5 % KHSO₄-Lösung (ca. 10 mL) und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel i.V. entfernt.

Ausbeute: 477 mg (2,06 mmol; 88,0 % der Theorie), farbloser Feststoff, HPLC = 25,1 min (Start bei 20 % LM B).

Boc-d-Val-OH (214)^[197]



214

Exact Mass: 217,13

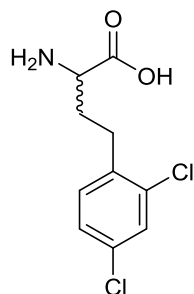
Molecular Weight: 217,27

Die Synthese der Zielverbindung **214** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **213** aus 313 mg (2,67 mmol) H-DVal-OH.

Ausbeute: 539 mg (2,48 mmol; 92,8 % der Theorie), farbloser Feststoff, HPLC = 27,1 min (Start bei 20 % LM B)

5.3.3 Synthese und Schutz der racemischen Homoaminosäuren

H-d/l-hPhe(2,4-Cl₂)-OH (75)^[168]



75

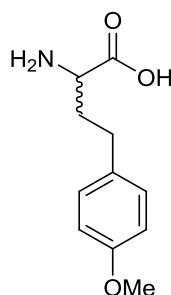
Exact Mass: 247,02
Molecular Weight: 248,10

643 mg (3,78 mmol) Ethyl-2-acetamido-cyanoacetat wurden in 7 mL Aceton gelöst und mit 960 mg (3,78 mmol; 1.00 Äquiv.) 2-(2,4-Dichlorphenyl)ethylbromid, 0.7 Äquiv. K₂CO₃, sowie 0.05 Äquiv. KI versetzt. Der Ansatz wurde bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) unter Rückfluss gekocht (ca. 6 Stunden), nach dem Abkühlen filtriert und das Filtrat i.V. eingengt. Das erhaltene Öl wurde in 20 mL 6N HCl gelöst und für 8 h unter Rückfluss gekocht. Der Ansatz wurde auf RT abgekühlt, der sich dabei bildende Feststoff abgesaugt und anschließend wieder in 20 mL 20 % MeOH gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mittels 1 N NaOH auf ca. 7 gestellt, der hierbei gebildete Feststoff wurde abgesaugt, mit wenig kaltem Ethanol gewaschen und i.V. getrocknet.

Ausbeute: 258 mg (1,04 mmol; 27,5% der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 23,6 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 248,02 (M+H)⁺.

H-d/l-hPhe(4-OMe)-OH (76)^[168]



76

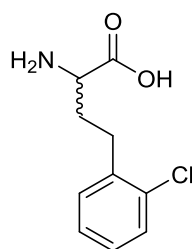
Exact Mass: 209,11
Molecular Weight: 209,25

Die Aminosäure wurde analog der Synthesebeschreibung für Verbindung **75** aus 864 mg (5,08 mmol) Ethyl-2-acetamido-cyanoacetat durch Umsetzung mit 1,09 g (5,08 mmol, 1.00 Äquiv.) 2-(4-Methoxyphenyl)ethylbromid, 0.7 Äquiv. K_2CO_3 und 0.05 Äquiv. KI hergestellt.

Ausbeute: 250 mg (1,19 mmol; 23,4% der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 13,6 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 210,12 (M+H)⁺.

H-D/L-hPhe(2-Cl)-OH (77)^[168]



77

Exact Mass: 213,06

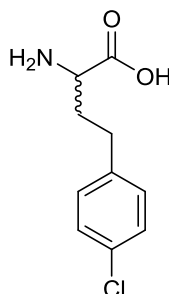
Molecular Weight: 213,66

Die Aminosäure wurde analog der Synthesebeschreibung für Verbindung **75** aus 696 mg (4,09 mmol) Ethyl-2-acetamido-cyanoacetat durch Umsetzung mit 898 mg (4,09 mmol, 1.00 Äquiv.) 2-(2-Chlorphenyl)ethylbromid, 0.7 Äquiv. K_2CO_3 und 0.05 Äquiv. KI hergestellt.

Ausbeute: 241 mg (1,13 mmol; 27,6 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 17,2 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 214,15 (M+H)⁺.

H-D/L-hPhe(4-Cl)-OH (78)^[168]



78

Exact Mass: 213,06

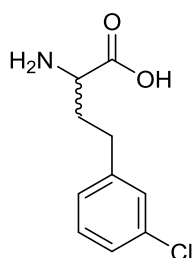
Molecular Weight: 213,66

Die Aminosäure wurde analog der Synthesebeschreibung für Verbindung **75** aus 2,04 g (11,99 mmol) Ethyl-2-acetamido-cyanoacetat durch Umsetzung mit 2,63 g (1,99 mmol, 1.00 Äquiv.) 2-(4-Chlorphenyl)ethylbromid, 0.7 Äquiv. K_2CO_3 und 0.05 Äquiv. KI hergestellt.

Ausbeute: 1,02 g (3,79 mmol; 39,9 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 19,4 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 214,09 (M+H)⁺.

H-D/L-hPhe(3-Cl)-OH (79)^[168]



79

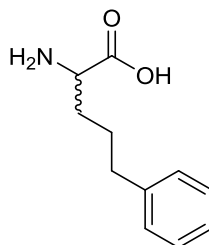
Exact Mass: 213,06
Molecular Weight: 213,66

Die Aminosäure wurde analog der Synthesebeschreibung für Verbindung **75** aus 1,15 g (6,73 mmol) Ethyl-2-acetamido-cyanoacetat durch Umsetzung mit 1,48 g (6,73 mmol, 1.00 Äquiv.) 2-(3-Chlorphenyl)ethylbromid, 0.7 Äquiv. K_2CO_3 und 0.05 Äquiv. KI hergestellt.

Ausbeute: 627 mg (2,93 mmol; 43,5 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 18,4 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 214,05 (M+H)⁺.

H-D/L-Gly(PropPhe)-OH (107)^[168]



107

Exact Mass: 193,11
Molecular Weight: 193,25

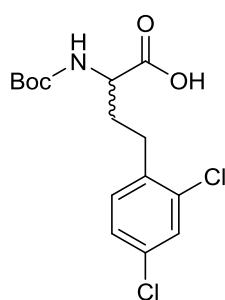
Die Aminosäure wurde analog der Synthesebeschreibung für Verbindung **(75)** aus 810 mg (4,76 mmol) Ethyl-2-acetamido-cyanoacetat durch Umsetzung mit 948 mg (4,76 mmol, 1.00 Äquiv.)

1-Brom-3-phenylpropan, 0.7 Äquiv. K_2CO_3 und 0.05 Äquiv. KI hergestellt.

Ausbeute: 475 mg (2,46 mmol; 51,6 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 18,4 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 194,09 ($M+H$)⁺.

Boc-D/L-hPhe(2,4-Cl₂)-OH (80**)**^[197]



80

Exact Mass: 347,07

Molecular Weight: 348,22

258 mg (1,04 mmol) H-D/L-hPhe(2,4-Cl₂)-OH (**75**) wurden in 6 mL Dioxan und 3 mL Wasser suspendiert und mit 1,2 mL 1 N NaOH versetzt. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt, mit 249 mg (1,14 mmol, 1.10 Äquiv.) Boc_2O versetzt und bis zum nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. weitestgehend entfernt, der Rückstand mit ca. 10 mL 5 % $KHSO_4$ -Lösung und 30 mL EtOAc versetzt und 2 × sauer und 3 × neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 307 mg (0,88 mmol; 91,7 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 23,1 min (Start bei 40 % LM B).

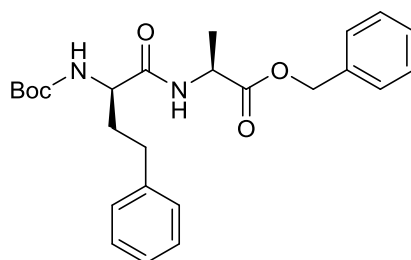
Die weiteren $N\alpha$ -Boc-geschützten Homophenylalaninderivate wurden analog der Verbindung **80** hergestellt. Die erhaltenen Ausbeuten und die bestimmten analytischen Daten sind in Tabelle 34 zusammengefasst.

Tabelle 34: N α -Boc-geschützte Homophenylalaninderivate. Start der HPLC-Läufe bei 20 % LM B.

Verbindung	Eingesetzte AS	HPLC min	Ausbeute in %
81	75	28,9	82,3
82	76	36,3	83,5
83	77	37,7	53,3
84	78	36,5	82,1
108	79	34,3	75,1

5.3.4 Synthese des Bausteines H-d-N(EtO-CM)hPhe-Ala-OH

Boc-D-hPhe-Ala-OBzl (215)



215

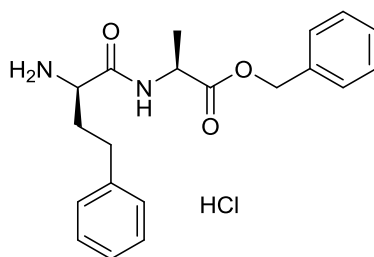
Exact Mass: 440,23
Molecular Weight: 440,54

857 mg (3,07 mmol) Boc-D-hPhe-OH (**212**) und 550 mg (3,07 mmol, 1.00 Äquiv.) H-Ala-OBzl wurden in 10 mL DMF bei 0 °C gelöst und mit 1,36 g BOP (3,07 mmol, 1.00 Äquiv.) und 1,07 mL (6,14 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA versetzt. Der Ansatz wurde 30 min unter Eiskühlung und 3 h bei RT gerührt. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde das LM i.V. eingengt, der Rückstand in EtOAc und 5 % KHSO₄-Lösung aufgenommen und 3 × sauer, 1 × neutral, 3 × basisch und 3 × neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das LM i.V. entfernt.

Ausbeute: 942 mg (2,14 mmol; 69,7 % der Theorie), braunes Öl, HPLC 23,0 min (Start bei 40 % LM B).

MS gefunden m/z: 441,15 (M+H)⁺.

H-D-hPhe-Ala-OBzl x HCl (216)



216

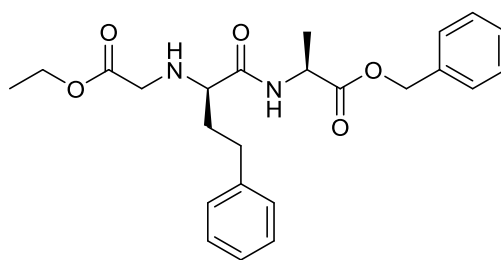
HCl-Salz	Freie Base
Exact Mass: 376,16	Exact Mass: 340,18
Molecular Weight: 376,88	Molecular Weight: 340,42

942 mg (2,14 mmol) Boc-D-hPhe-Ala-OBzl (**215**) wurden mit 10 mL 1N HCl in AcOH versetzt und der Ansatz bei RT für eine Stunde unter gelegentlichem Umschütteln stehen gelassen, nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) in 35 mL Ether gefällt

und 15 min zentrifugiert (5 °C \ 5000 rpm). Nach Abgiessen des Überstandes wurde erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert, der Überstand abgegossen und der erhaltene Feststoff i.V. getrocknet.

Ausbeute: 530 mg (1,41 mmol; 65,9 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 32,8 min (Start bei 10 % LM B).

H-D-N(EtO-CM)hPhe-Ala-OBzl (217)



217

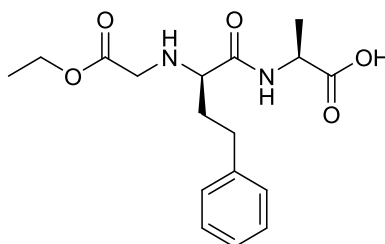
Exact Mass: 426,22
Molecular Weight: 426,51

530 mg (1,41 mmol) H-D-hPhe-Ala-OBzl × HCl (**216**) wurden in 20 mL DMF gelöst und mit 653 mg (2,82 mmol, 2.00 Äquiv.) Silber(I)oxid versetzt. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt, mit 282 mg (1,69 mmol, 1.20 Äquiv.) Bromessigsäureethylester versetzt und 6 h bei RT gerührt. Der Ansatz wurde durch Cellite filtriert. Das LM wurde i.V. weitestgehend entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und 1 × mit wenig 5 % KHSO₄-Lösung, 1 × neutral, 3 × basisch und 2 × neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. entfernt.

Ausbeute: 523 mg (1,23 mmol; 87,2 % der Theorie), gelbes Öl, HPLC 27,9 min (Start bei 20 % LM B).

MS gefunden m/z: 427,00 (M+H)⁺.

H-D-N(EtO-CM)hPhe-Ala-OH (116)



116

Exact Mass: 336,17
Molecular Weight: 336,39

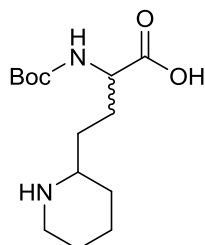
523 mg (1,23 mmol) H-D-N(EtO-CM)hPhe-Ala-OBzl (**217**) wurden in 20 mL 90 % Essigsäure gelöst, mit 50 mg 10 % Pd/C und Wasserstoff versetzt und der Ansatz 6 h bei RT hydriert. Nach fast vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde der Katalysator durch Filtration entfernt und das Filtrat i.V. eingengt.

Ausbeute: 375 mg (1,11 mmol; 90,2 % der Theorie), braunes Öl, HPLC 21,3 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 337,04 (M+H)⁺.

5.3.5 Synthese des Bausteines Boc-D/L-hAla(piperid(N-Boc)-2-yl)-OH

Boc-D/L-hAla(piperid-2-yl)-OH (**218**)



218

Exact Mass: 286,19

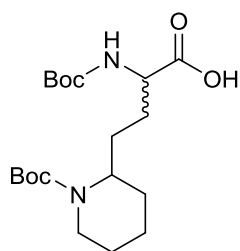
Molecular Weight: 286,37

175 mg (0,62 mmol) Boc-D/L-hAla(piperid-2-yl)-OH wurden in 5 mL über Molsieb getrocknetem Methanol gelöst und unter Schutzgas mit einer Spatelspitze PtO₂ versetzt. Der Ansatz wurde bei Normaldruck mittels Wasserstoff hydriert und nach fast vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) filtriert und i.V. eingengt.

Ausbeute: 152 mg (0,53 mmol; 85,5 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 14,8 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 287,12 (M+H)⁺

Boc-D\l-hAla(piperid(N-Boc)-2-yl)-OH (**219**)



219

Exact Mass: 386,24

Molecular Weight: 386,49

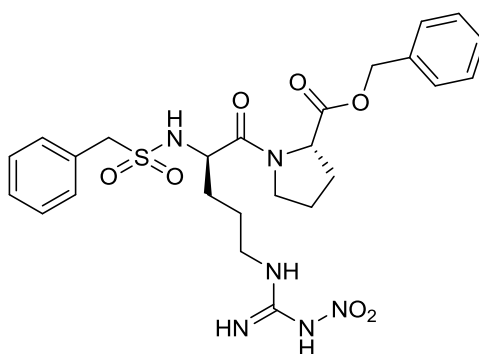
55 mg (0,19 mmol) Boc-D\l-hAla(piperid-2-yl)-OH (**218**) wurden in 1,5 mL einer Dioxan/Wasser-Mischung (2/1) gelöst, mit 0,20 mL 1N NaOH und 100 mg (0,46 mmol, 2.40 Äquiv.) Boc₂O versetzt und bei RT gerührt. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle per HPLC) wurde das Dioxan i.V. entfernt, der Ansatz mit 5 mL EtOAc und 5 mL 5 % KHSO₄ aufgenommen und die organische Phase 2 × sauer und 2 × neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel i.V. eingengt.

Ausbeute: 45 mg (63,2 % der Theorie; 0,12 mmol), brauner Feststoff, HPLC 24,4 min (Start bei 40 % LM B).

MS gefunden m/z: 387,18 (M+H)⁺.

5.3.6 Synthese des Bausteines Bzls-d-Arg-Pro-OH × HCl

Bzls-D-Arg(NO₂)-Pro-OBn (**220**)



220

Exact Mass: 560,21

Molecular Weight: 560,63

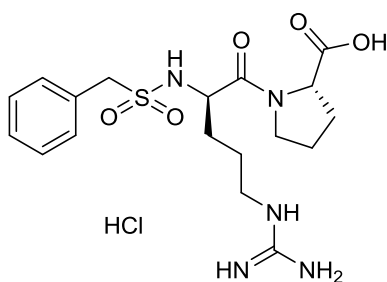
502 mg (2,08 mmol) H-Pro-OBn × HCl und 777 mg (2,08 mmol; 1.00 Äquiv.) Bzls-d-Arg(NO₂)-OH wurden in 20 mL DMF gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und mit 920 mg BOP (2,08 mmol; 1.00 Äquiv.) und 1,09 mL (6,24 mmol, 3.00 Äquiv.) DIPEA versetzt, 15 min unter Kühlung sowie 3h bei RT gerührt und nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle

mittels HPLC) i.V. eingeengt. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen, 3 × mit 5 % KHSO₄, 3 × mit Brine und 3 × mit gesättigter NaHCO₃ gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i.V. eingeengt.

Ausbeute: 1099 mg (1,96 mmol; 94,2% der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 30,2 min (Start bei 20 % LM B)

MS ber. m/z: 560,21 (M), MS gefunden m/z: 561,15 (M+H)⁺.

Bzls-D-Arg-Pro-OH × HCl (139)



139

Freie Base	HCl-Salz
Exact Mass: 425,17	Exact Mass: 461,15
Molecular Weight: 425,50	Molecular Weight: 461,96

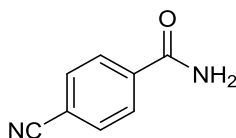
1,10 g (1,96 mmol) Bzls-D-Arg(NO₂)-Pro-O(Bzl) (**220**) wurden in 40 mL Eisessig gelöst, mit 3 mL 1N HCl und 100 mg 10 % Pd/C versetzt und mittels H₂ bei Normaldruck hydriert. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde der Ansatz filtriert und das LM i.V. entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde i.V. getrocknet.

Ausbeute: 841 mg (1,82 mmol; 92,8 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 18,1 min (Start bei 10 % LM B)

MS gefunden m/z: 426,125 (M+H)⁺.

5.3.7 Synthese des Bausteines 4-Aminomethylbenzoesäureamid × HCl

4-Cyanobenzoessäureamid (221)



221

Exact Mass: 146,05

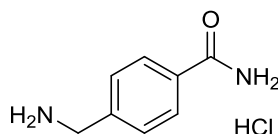
Molecular Weight: 146,15

2,52 g (17,13 mmol) 4-Cyanobenzoessäure wurden in 40 mL EtOAc suspendiert und mit 9,16 g (171,3 mmol; 10.00 Äquiv.) Ammoniumchlorid, 7,15 g (18,84 mmol; 1,10 Äquiv.) HBTU sowie 8,94 ml (51,39 mmol; 3.00 Äquiv.) DIPEA versetzt. Der Ansatz wurde ca. 4 h unter Rückfluss gekocht (Reaktionskontrolle mittels HPLC) und anschließend das LM i.V. entfernt.

Der Rückstand wurde in einer Mischung aus EtOAc und einer 5 % KHSO₄-Lösung aufgenommen und die organische Phase 3 × sauer, 1 × neutral, 3 × basisch und 3 × neutral gewaschen sowie über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde i.V. eingengt.

Ausbeute: 573 mg (3,92 mmol; 22,9% der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 10,7 min (Start bei 10 % LM B).

4-Aminomethylbenzoesäureamid × HCl (222)



222

Freie Base

HCl-Salz

Exact Mass: 150,08

Exact Mass: 186,06

Molecular Weight: 150,18

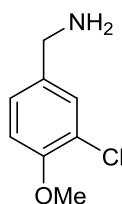
Molecular Weight: 186,64

454 mg (3,11 mmol) 4-Cyanobenzoessäureamid (**221**) wurden in 20 mL 90 % Essigsäure gelöst, mit ca. 50 mg 10 % Pd/C versetzt und mittels Wasserstoff bei Normaldruck über Nacht hydriert. Der Katalysator wurde durch Filtration entfernt und das LM i.V. weitestgehend eingengt. Der Rückstand wurde mit HCl angesäuert, die Lösung in Ether eingetropfelt und das ausgefallene Produkt zentrifugiert (5 min, 4 °C, 5000 rpm). Nach Dekantieren des Überstandes wurde der zurückbleibende Feststoff i.V. getrocknet.

Ausbeute: 400 mg (2,14 mmol; 68,8% der Theorie), brauner Feststoff, HPLC 16,9 min (Start bei 10 % LM B)

5.3.8 Synthese des Bausteines 3-Chlor-4-Hydroxybenzylamin

3-Chlor-4-Methoxybenzylamin (**223**)^[198]



223

Exact Mass: 171,05

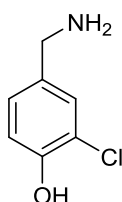
Molecular Weight: 171,62

11,81 g (86,98 mmol) 4-Methoxybenzylamin wurden in 130 mL Benzylamin gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und portionsweise über 10 min mit 10 mL Sulfurylchlorid versetzt. Es wurde 4 h bei RT gerührt und daran anschließend auf 100 mL Diethylether gegossen. Der hierbei gebildete Feststoff wurde abgesaugt und i.V. getrocknet.

Ausbeute: 13,01 g (75,81 mmol; 87,2 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC = 12,7 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 565,39 (M+Na)+.

3-Chlor-4-Hydroxybenzylamin (**224**)^[198]



224

Exact Mass: 157,03

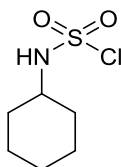
Molecular Weight: 157,60

4,94 g (28,78 mmol) 3-Chlor-4-Methoxybenzylamin (**223**) wurden in 50 mL 48 % HBr gelöst und für 4 h unter Rückfluß gekocht. Der Ansatz wurde abgekühlt, der hierbei ausfallende Feststoff abgesaugt, mit Ethanol und EtOAc gewaschen und i.V. getrocknet.

Ausbeute: 3,61 g (22,91 mmol; 79,6 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC = 13,5 min (Start bei 1 % LM B).

5.3.9. Synthese von Cyclohexylsulfamoylchlorid

Cyclohexylsulfamoylchlorid (**225**)^[199]



225

Exact Mass: 197,03

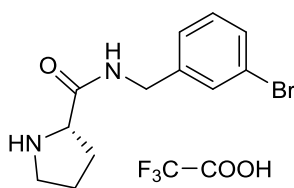
Molecular Weight: 197,68

5,77 g (28,7 mmol) Cyclamat wurden in 100 mL Benzol suspendiert, nach Eiskühlung des Ansatzes mit (28,7 mmol, 1.00 Äquiv.) Phosphorpentachlorid versetzt, 10 min unter Eiskühlung gerührt und für 5 Stunden am Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz filtriert, um die unlöslichen Stoffe abzutrennen, und das Filtrat i.V. eingengt. Die Verbindung wurde nicht weiter charakterisiert und direkt zur Synthese des Intermediates **226** eingesetzt.

Ausbeute: 3,53 g (17,9 mmol; 62,3 % der Theorie), weißer Feststoff.

5.3.10 Synthese von Bausteinen des Typs Pro-Amb(X)

H-Pro-3-Brombenzylamin × TFA (**227**)



227

Freie Base

TFA-Salz

Exact Mass: 282,04

Exact Mass: 396,03

Molecular Weight: 283,17

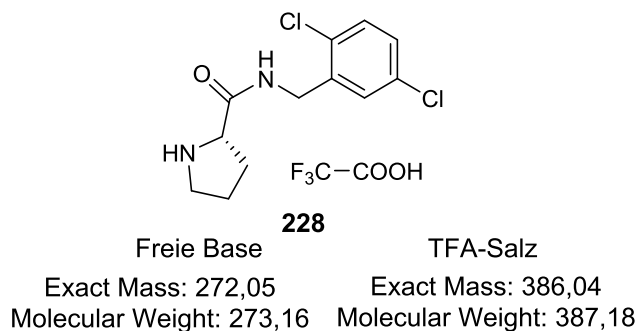
Molecular Weight: 397,19

577 mg (3,10 mmol) 3-Brombenzylamin und 668 mg (3,10 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-Pro-OH wurden in 10 mL DMF gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und mit 1,37 g BOP (3,10 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie 1,08 mL (6,20 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA versetzt, 15 min unter Eiskühlung und 3 h bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. eingengt, der Rückstand mit 10 mL TFA versetzt und 1 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde in 40 mL Ether eingetropft und das ausgefallene Produkt abzentrifugiert (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm). Der Überstand wurde abdekantiert, der Feststoff in 40 mL Ether resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der

ausgefallene Feststoff wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das Lösemittel i.V. teilweise eingengt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 398 mg (1,00 mmol; 32,3 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 21,1 min (Start bei 10 % LM B)

H-Pro-(2,5-Dichlor)benzylamin × TFA (228)

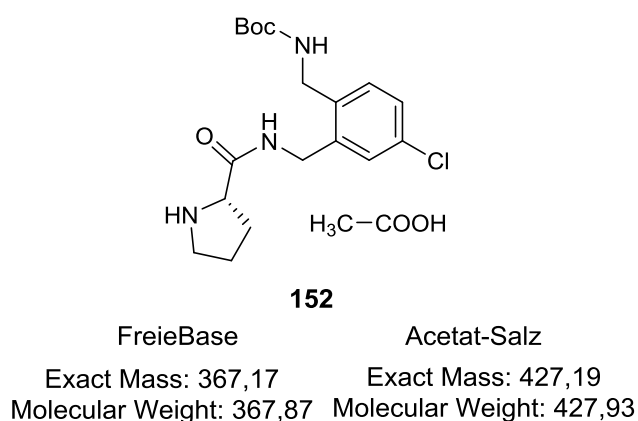


Die Synthese der Zielverbindung **228** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **227** aus 246 mg (1,40 mmol) 2,5-Dichlobenzylamin und 668 mg (1,40 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-Pro-OH in 10 mL DMF.

Ausbeute: 112 mg (0,29 mmol; 20,7 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 22,5 min (Start bei 10 % LM B).

5.3.11 Synthese der Bausteine des Typs P2-AMBCB

H-Pro-ABMBCB × Acetat (152)

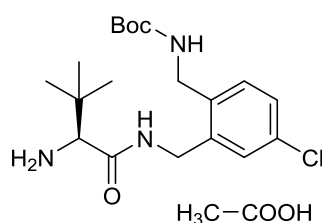


361 mg (1,33 mmol) (2-Boc-Aminomethyl-5-chlor)benzylamin und 449 mg (1,33 mmol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-Pro-OH wurden in 5 mL DMF gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und mit 588 mg BOP (1,33 mmol, 1.00 Äquiv.) und 463 µL (2,66 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA versetzt. Anschließend wurde 15 min unter Eiskühlung und 3 h bei RT. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde das LM i.V. eingengt und der Rückstand mit 5 mL 10 % Diethylamin in DMF gelöst und 1h bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. weitestgehend eingengt und der Rückstand unter Eiskühlung vorsichtig mit Essigsäure auf pH 3 angesäuert. Die Lösung wurde in Ether eingetroppt und der ausgefallene Feststoff durch Zentrifugation isoliert (5 min, 4 °C, 5000 rpm) und i.V. getrocknet.

Ausbeute: 465 mg (1,09 mmol; 81,9% der Theorie), gelblicher Feststoff, HPLC 19,9 min (Start bei 20 % LM B).

MS gefunden m/z: 368,15 (M+H)⁺.

H-Tle-ABMCB × Acetat (**229**)



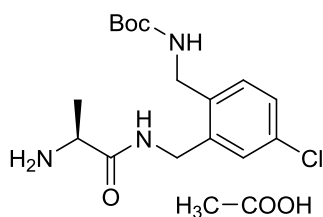
229	
Freie Base	Acetat-Salz
Exact Mass: 383,20	Exact Mass: 443,22
Molecular Weight: 383,92	Molecular Weight: 443,97

Die Synthese der Zielverbindung **229** erfolgte analog der Beschreibung für das Intermediat **152** aus 283 mg (1,05 mmol) (2-Boc-Aminomethyl-5-chlor)benzylamin und 371 mg (1,05mol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-Tle-OH in 5 mL gelöst.

Ausbeute: 334 mg (0,75 mmol; 71,4% der Theorie), gelblicher Feststoff, HPLC 23,8 min (Start bei 20 % LM B).

MS gefunden m/z: 383,18 (M+H)⁺.

H-Ala-ABMCB × Acetat (**230**)



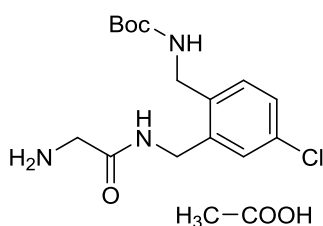
230

Freie Base	Acetat-Salz
Exact Mass: 341,15	Exact Mass: 401,17
Molecular Weight: 341,84	Molecular Weight: 401,89

Die Synthese der Zielverbindung **230** erfolgte analog der Vorschrift für Intermediat **152** aus 334 mg (1,23 mmol) (2-Boc-Aminomethyl-5-chlor)benzylamin und 405 mg (1,23mmol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-Ala-OH × H₂O in 5 mL DMF.

Ausbeute: 258 mg (0,64 mmol; 52,0 % der Theorie), gelblicher Feststoff, HPLC 26,8 min (Start bei 10 % LM B)

H-Gly-ABMCB × Acetat (**231**)



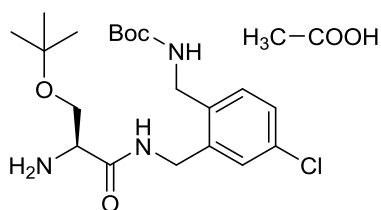
231

Freie Base	Acetat-Salz
Exact Mass: 327,13	Exact Mass: 387,16
Molecular Weight: 327,81	Molecular Weight: 387,86

Die Synthese der Zielverbindung **231** erfolgte analog der Vorschrift für Intermediat **152** aus 311 mg (1,15 mmol) (2-Boc-Aminomethyl-5-chlor)benzylamin und 342 mg (1,15mmol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-Gly-OH in 5 mL DMF.

Ausbeute: 124 mg (0,32 mmol; 27,8 % der Theorie), gelblicher Feststoff, HPLC 15,8 min (Start bei 20 % LM B)

H-Ser(tBu)-ABMCB × Acetat (**232**)



232

Freie Base

Acetat-Salz

Exact Mass: 413,21

Exact Mass: 473,23

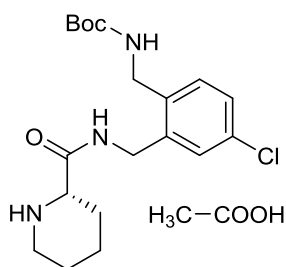
Molecular Weight: 413,94

Molecular Weight: 474,00

Die Synthese der Zielverbindung **232** erfolgte analog der Vorschrift für Intermediat **152** aus 307 mg (1,13 mmol) (2-Boc-Aminomethyl-5-chlor)benzylamin und 433 mg (3,13mmol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-Ser(tBu)-OH in 5 mL DMF.

Ausbeute: 201 mg (0,42 mmol; 37,2 % der Theorie), gelblicher Feststoff, HPLC 24,6 min (Start bei 20 % LM B).

H-hPro-ABMCB × Acetat (**233**)



233

Base

Acetat-Salz

Exact Mass: 381,18

Exact Mass: 441,20

Molecular Weight: 381,90

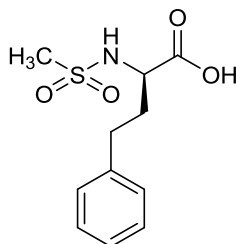
Molecular Weight: 441,95

Die Synthese der Zielverbindung **233** erfolgte analog der Vorschrift für Intermediat **152** aus 345 mg (1,27 mmol) (2-Boc-Aminomethyl-5-chlor)benzylamin und 446 mg (1,27mol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-hPro-OH in 5 mL DMF.

Ausbeute: 182 mg (0,41 mmol; 32,3 % der Theorie), gelblicher Feststoff, HPLC 17,8 min (Start bei 20 % LM B).

5.3.12 Bausteine des Typs R-Sulfonyl-P3-OH

Mes-D-hPhe-OH (234)



234

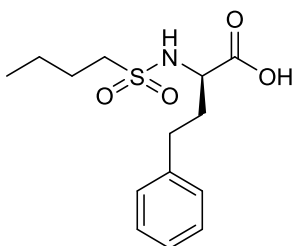
Exact Mass: 257,07

Molecular Weight: 257,30

88 mg (0,49 mmol) H-D-hPhe-OH wurden in 5 mL ACN und 3 mL H₂O gelöst und nach Zugabe von 256 µL (1,47 mmol, 3 Äquiv.) DIPEA unter Eiskühlung des Ansatzes mit 76 µL (0,98 mmol, 2,00 Äquiv) Mesylchlorid, gelöst in 4 mL ACN, über 15 min portionsweise versetzt. Im Verlauf der Reaktion wurde der Ansatz durch weitere Zugabe von DIPEA bei pH 8-9 konstant gehalten. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde der Ansatz i.V. eingeeengt, der ölige Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und 3 × sauer sowie 3 × neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und i.V. eingeeengt.

Ausbeute: 62 mg (0,24 mmol; 48,9 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 17,6 min (Start bei 20 % LM B).

Butylsulfonyl-D-hPhe-OH (115)



115

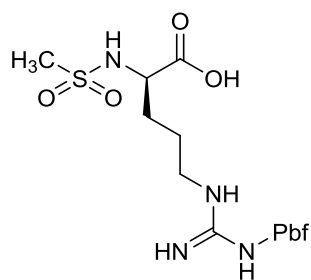
Exact Mass: 299,12

Molecular Weight: 299,38

61 mg (0,34 mmol) H-D-hPhe-OH wurden in 3 mL ACN und 3 mL H₂O gelöst und nach Zugabe von 177 µL (1,02 mmol, 3,00 Äquiv.) DIPEA unter Eiskühlung mit 107 mg Butylsulfonylchlorid (0,68 mmol, 2,00 Äquiv., gelöst in 3 mL ACN) über 15 min portionsweise versetzt. Die weiteren Schritte erfolgten analog zur Darstellung der Verbindung **234**.

Ausbeute: 53 mg (0,18 mmol; 52,9 % der Theorie), gelblicher Feststoff, HPLC 29,6 (Start bei 20 % LM B).

Mes-D-Arg(Pbf)-OH (**120**)



120

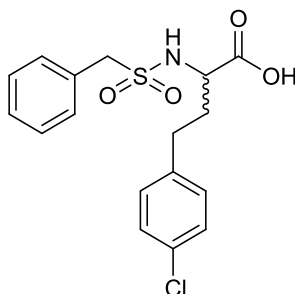
Exact Mass: 504,17

Molecular Weight: 504,62

3,15 g (7,39 mmol) H-D-Arg(Pbf)-OH wurden in 45 mL ACN und 45 mL H₂O gelöst und nach Zugabe von 3,86 mL (22,17 mmol, 3.00 Äquiv.) DIPEA unter Eiskühlung mit 1,71 mL MesCl (22,17 mmol, 3.00 Äquiv.) über 15 min portionsweise versetzt. Die weiteren Schritte erfolgten analog zur Darstellung der Verbindung **234**.

Ausbeute: 2,01 g (3,98 mmol; 53,9 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 23,3 min (Start bei 20 % LM B).

Bzls-D/L-hPhe(4-Cl)-OH (**235**)



235

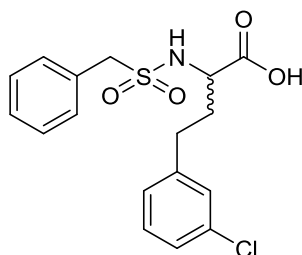
Exact Mass: 367,06

Molecular Weight: 367,84

309 mg (1,45 mmol) H-D/L-hPhe(4-Cl)-OH (**78**) wurden in 10 mL getrocknetem ACN und 5 mL H₂O suspendiert und unter Eiskühlung portionsweise mit 505 µl (2,90 mmol; 2.00 Äquiv.) DIPEA und 553 µg (2,90 mmol, 2.00 Äquiv.) Benzylsulfonylchlorid versetzt und der Ansatz bei RT gerührt. Im Verlaufe der Reaktion wurde der pH-Wert durch weitere Zugabe von DIPEA auf 8-9 konstant gehalten. Anschließend wurde das LM i.V. eingeeengt, der Rückstand in einer Mischung aus EtOAc und 5 % KHSO₄-Lösung aufgenommen und 2 × sauer und 3 × neutral gewaschen, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingeeengt.

Ausbeute: 178 mg (0,48 mmol; 33,1 % der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 24,9 min (Start bei 30 % LM B).

Bzls-DL-hPhe(3-Cl)-OH (**236**)



236

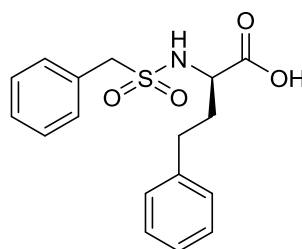
Exact Mass: 367,06

Molecular Weight: 367,84

Die Synthese der Zielverbindung **236** erfolgte analog der Vorschrift für Intermediat **235**, ausgehend von 418 mg (1,96 mmol) H-D/L-hPhe(3-Cl)-OH (**79**).

Ausbeute: 185 mg (0,50 mmol; 25,5 % der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 23,8 min (Start bei 30 % LM B).

Bzls-D-hPhe-OH (**151**)^[200]



151

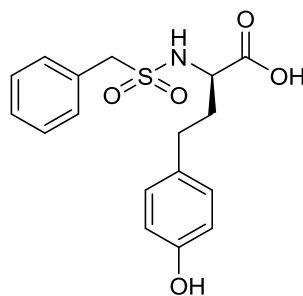
Exact Mass: 333,10

Molecular Weight: 333,40

887 mg (4,92 mmol) H-d-Homophenylalanin wurden in 10 mL getrocknetem DCM suspendiert und mit 1,38 mL (10,82 mmol, 2.20 Äquiv.) Trimethylsilylchlorid sowie 1,88 mL (10,82 mmol, 2.20 Äquiv.) DIPEA versetzt. Der Ansatz wurde für 1 h unter Rückfluß gekocht, nach wenigen Minuten entstand hierbei eine klare Lösung. Anschließend wurde der Ansatz im Eisbad abgekühlt und mit 856 µL (4,92 mmol, 1.00 Äquiv.) DIPEA und 937 mg (4,92 mmol, 1.00 Äquiv.) Benzylsulfonylchlorid versetzt. Der Ansatz wurde 30 min unter Eiskühlung und 3 h bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. entfernt, der Rückstand mit einer Mischung aus EtOAc und H₂O aufgenommen und 3 × sauer und 3 × neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingeeengt.

Ausbeute: 1,32 g (3,96 mmol; 80,3% der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 26,7 min (Start bei 20 % LM B).

Bzls-D-hTyr-OH (**193**)



193

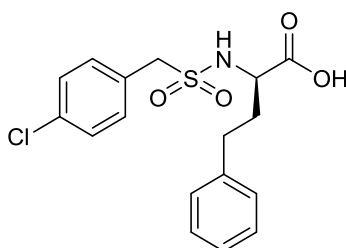
Exact Mass: 349,10

Molecular Weight: 349,40

Die Synthese der Zielverbindung **193** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **151** aus 445 mg (1,61 mmol) H-D-hTyr-OH × HBr (Iris) in 10 mL trockenem DCM.

Ausbeute: 357 mg (1,02 mmol; 63,4% der Theorie), brauner Feststoff, HPLC 21,8 min (Start bei 20 % LM B)

4-Cl-Bzls-D-hPhe-OH (**237**)



237

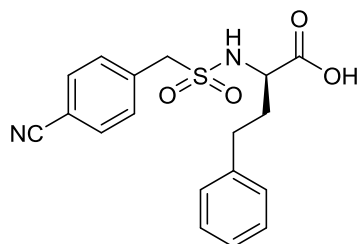
Exact Mass: 367,06

Molecular Weight: 367,84

Die Synthese der Zielverbindung **237** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **151** aus 124 mg (0,69 mmol) H-D-Homophenylalanin und 156 mg (0,69 mmol, 1.00 Äquiv.) 4-Chlorbenzylsulfonylchlorid in 10 mL trockenem DCM.

Ausbeute: 224 mg (0,61 mmol; 88,4 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 23,5 min (Start bei 30 % LM B).

4-CN-Bzls-D-hPhe-OH (**238**)



238

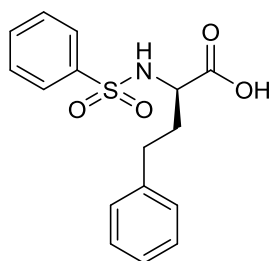
Exact Mass: 358,10

Molecular Weight: 358,41

Die Synthese der Zielverbindung **238** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **151** aus 113 mg (0,63 mmol) H-D-Homophenylalanin und 136 mg (0,63 mmol, 1.00 Äquiv.) 4-Cyanobenzylsulfonylchlorid in 10 mL trockenem DCM.

Ausbeute: 121 mg (0,34 mmol; 53,9 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 17,7 min (Start bei 30 % LM B).

Benzolsulfonyl-D-hPhe-OH (**239**)



239

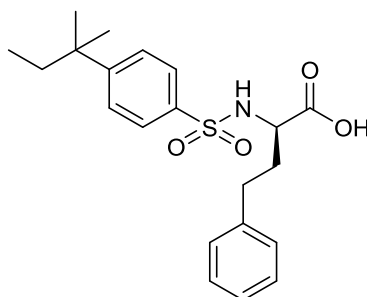
Exact Mass: 319,09

Molecular Weight: 319,38

Die Synthese der Zielverbindung **239** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **151** aus 125 mg (0,70 mmol) H-D-Homophenylalanin und 124 mg (0,70 mmol, 1.00 Äquiv.) Benzolsulfonylchlorid in 10 mL trockenem DCM.

Ausbeute: 176 mg (0,55 mmol; 78,6 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 17,5 min (Start bei 30 % LM B).

4(tert-Amyl)Benzolsulfonyl-D-hPhe-OH (**240**)



240

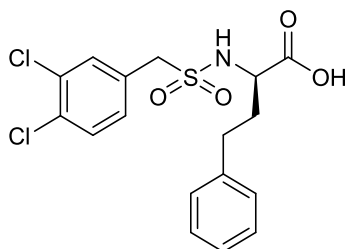
Exact Mass: 389,17

Molecular Weight: 389,51

Die Synthese der Zielverbindung **240** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **151** aus 82 mg (0,46 mmol) H-D-Homophenylalanin 114 mg (0,46 mmol, 1.00 Äquiv.) 4(tertAmyl)Benzolsulfonylchlorid in 10 mL trockenem DCM.

Ausbeute: 151 mg (0,39 mmol; 84,8 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 31,8 min (Start bei 30 % LM B).

(3,4-Cl₂)bzls-D-hPhe-OH (**241**)



241

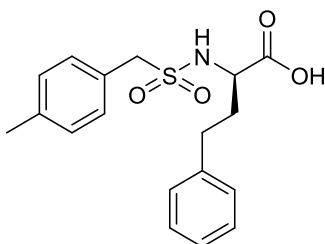
Exact Mass: 401,03

Molecular Weight: 402,29

Die Synthese der Zielverbindung **241** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **151** aus 100 mg (0,56 mmol) H-D-Homophenylalanin und 145 mg (0,56 mmol, 1.00 Äquiv.) 3,4-Cl₂-Benzylsulfonylchlorid in 10 mL trockenem DCM.

Ausbeute: 125 mg (0,31 mmol; 55,4 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 26,5 min (Start bei 30 % LM B).

(4-Me)Bzls-D-hPhe-OH (242)



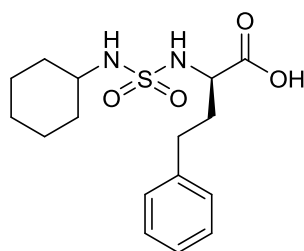
242

Exact Mass: 347,12
Molecular Weight: 347,43

Die Synthese der Zielverbindung **242** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **151** aus 109 mg (0,61 mmol) H-D-Homophenylalanin und 125 mg (0,61 mmol, 1.00 Äquiv.) 4-Methylbenzylsulfonylchlorid in 10 mL trockenem DCM.

Ausbeute: 22 mg (0,06 mmol; 9,8 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 21,8 min (Start bei 30 % LM B).

Cyclohexylsulfamoyl-D-hPhe-OH (226)



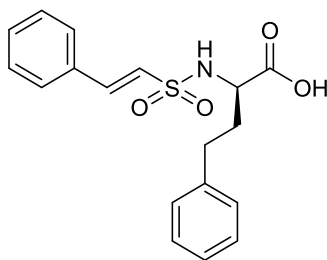
226

Exact Mass: 340,15
Molecular Weight: 340,44

Die Synthese der Zielverbindung **226** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **151** aus 163 mg (0,91 mmol) H-D-Homophenylalanin und 180 mg (0,91 mmol, 1.00 Äquiv.) Cyclohexylsulfamoylchlorid **225** in 10 mL trockenem DCM.

Ausbeute: 264 mg (0,78 mmol; 85,7 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 20,7 min (Start bei 30 % LM B).

Styrolsulfonyl-D-hPhe-OH (**243**)



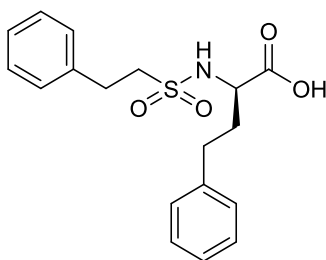
243

Exact Mass: 345,10
Molecular Weight: 345,41

Die Synthese der Zielverbindung **243** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **151** aus 367 mg (2,05 mmol) H-D-Homophenylalanin und 415 mg (2,05 mmol, 1.00 Äquiv.) Styrolsulfonylchlorid in 10 mL trockenem DCM.

Ausbeute: 639 mg (1,85 mmol; 90,2 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 21,4 min (Start bei 30 % LM B).

Phenethylsulfonyl-D-hPhe-OH (**244**)



244

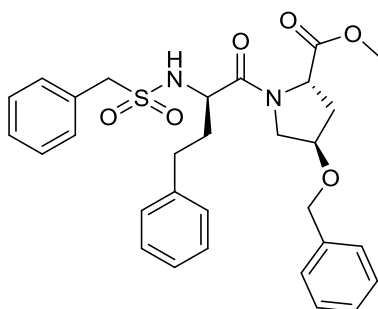
Exact Mass: 347,12
Molecular Weight: 347,43

490 mg (1,41 mmol) Styrolsulfonyl-D-hPhe-OH **243** wurden in 25 mL EtOAc gelöst, mit 50 mg 10 % Pd/C versetzt und mittels Wasserstoff bei Normaldruck hydriert. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde der Ansatz filtriert und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 372 mg (1,07 mmol; 75,9 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 25,2 min (Start bei 30 % LM B).

5.3.13 Synthese des Bausteines Bzls-d-hPhe-Hyp(Bzl)-OH

Bzls-d-hPhe-4R-Hyp(Bzl)-MeO (245)



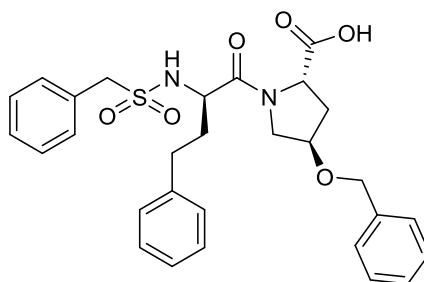
245

Exact Mass: 550,21
Molecular Weight: 550,67

165 mg (0,61 mmol) 4R-Hyp(Bzl)-MeO \times HCl (Bachem) und 203 mg (0,61 mmol, 1.00 Äquiv.) Bzls-D-hPhe-OH (**151**) wurden in 10 mL DMF gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und mit 270 mg BOP (0,61 mmol, 1.00 Äquiv.) und 318 mL (1,83 mmol, 3.00 Äquiv.) DIPEA versetzt, 15 min unter Eiskühlung und 3 h bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. eingeeengt, der Rückstand in einer Mischung aus EtOAc und 5 % KHSO₄ aufgenommen und 3 \times sauer, 1 \times neutral, 3 \times basisch und 3 \times neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und i.V. eingeeengt.

Ausbeute: 194 mg (0,35 mmol; 57,3% der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 33,3 min (Start bei 30 % LM B)

Bzls-D-hPhe-Hyp(Bzl)-OH (246)



246

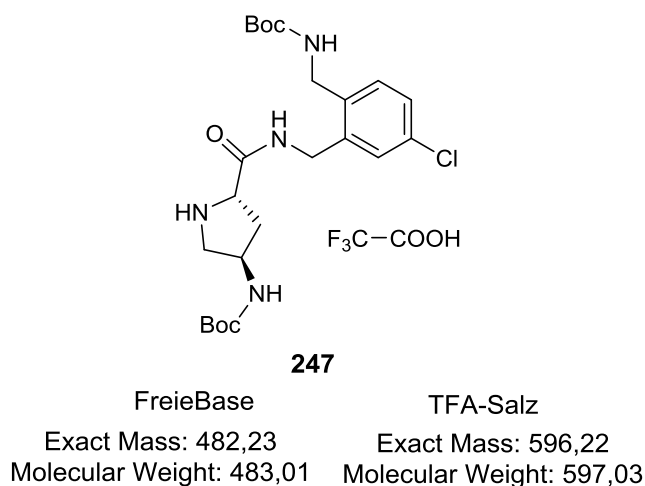
Exact Mass: 536,20
Molecular Weight: 536,64

194 mg (0,35 mmol) Bzls-D-hPhe-Hyp(Bzl)-MeO (**245**) wurden mit 1,5 mL 1N NaOH und 1,5 mL Dioxan gelöst. Der Ansatz wurde ca. 2 h bei RT gerührt und anschließend mit einer Mischung aus 15 mL EtOAc und 15 mL 5 % KHSO₄ aufgenommen. Die organische Phase wurde 3 \times sauer und 3 \times neutral gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und i.V. eingeeengt.

Ausbeute: 162 mg (0,30 mmol; 85,7 % der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 27,9 min (Start bei 30 % LM B).

5.3.14 Bausteine des Typs H-Pro(R)-ABMCB

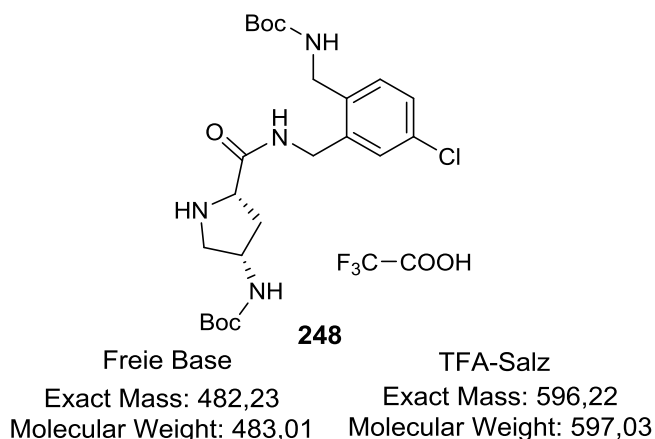
H-Pro-(4R-Boc-NH)-ABMCB × TFA (247)



96 mg (0,35 mmol) (2-Boc-Aminomethyl-5-chlor)benzylamin und 158 mg (0,35 mmol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-4R-Amino-Pro-OH wurden in 5 mL DMF gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und mit 155 mg BOP (0,35 mmol, 1.00 Äquiv.) und 122 µL (0,70 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA versetzt, 15 min unter Eiskühlung und 3 h bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. eingengt und der ölige Rückstand in ca. 3 mL 10 % Diethylamin in DMF gelöst und 1 h bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. eingengt, der Rückstand mit HCOOH auf pH 3 angesäuert und mittels präparativer HPLC gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt, durch Zugabe von H₂O auf ca. 20 % ACN verdünnt und lyophilisiert.

Ausbeute: 113 mg (0,19 mmol; 54,3 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 16,9 min (Start bei 30 % LM B)

H-Pro-(4S-Boc-NH)-ABMCB × TFA (248)

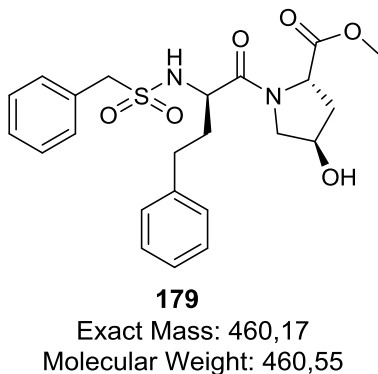


Die Synthese der Zielverbindung **248** erfolgte analog der Vorschrift für Intermediat **247** aus 100 mg (0,37 mmol) (2-Boc-Aminomethyl-5-chlor)benzylamin und 167 mg (0,37 mmol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-4S-Amino-Pro-OH in 5 mL DMF.

Ausbeute: 71 mg (0,12 mmol; 32,4 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 17,4 min (Start bei 30 % LM B)

5.3.15 Bausteine des Typs P4-P3-Pro(4S-NH₂)-OH

Bzls-D-hPhe-Pro(4R-OH)-MeO (179)

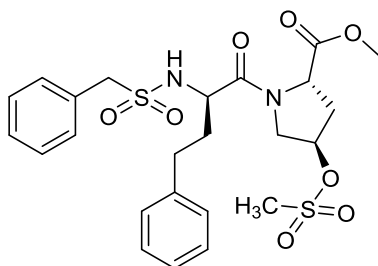


1,24 g (3,72 mmol) Bzls-d-hPhe-OH (**151**) und 676 mg (3,72 mmol, 1.00 Äquiv.) H-Pro(4R-OH)-MeO × HCl wurden in 10 mL DMF gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt, mit 1,64 g BOP (3,72 mmol, 1.00 Äquiv.) und 1,94 mL (11,16 mmol, 3.00 Äquiv.) DIPEA versetzt, 15 min unter Eiskühlung und 3 h bei RT gerührt. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde das LM i.V. entfernt, der Rückstand mit einer Mischung aus EtOAc und 5 % KHSO₄ aufgenommen und 3 × sauer, 1 × neutral, 3 × basisch sowie 3 × neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 1,24 g (2,70 mmol; 72,6 % der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 19,9 min (Start bei 30 % LM B).

MS gefunden m/z: 459,22 (M-H)⁻.

Bzls-D-hPhe-Pro(4R-OMs)-MeO (180)^[201]



180

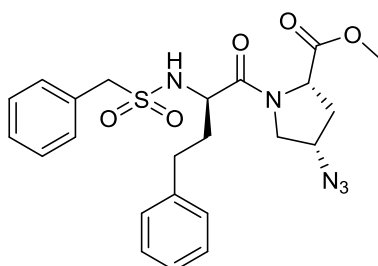
Exact Mass: 538,14

Molecular Weight: 538,63

1,20 g (2,61 mmol) Bzls-D-hPhe-Pro(4R-OH)-MeO (**179**) wurden in 30 mL trockenem DCM gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und mit 438 µL (3,13 mmol,; 1.20 Äquiv.) Triethylamin und 242 µL (3,13 mmol, 1.20 Äquiv.) Mes-Cl versetzt und bei RT ca. 8 h gerührt (Reaktionskontrolle mittels HPLC). Das LM wurde i.V. entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde 3 × sauer, 1 × neutral, 3 × basisch und 3 × neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 1,00 g (1,86 mmol; 71,3 % der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 26,9 min (Start bei 30 % LM B)

Bzls-D-hPhe-Pro(4S-N₃)-MeO (181)^[201]



181

Exact Mass: 485,17

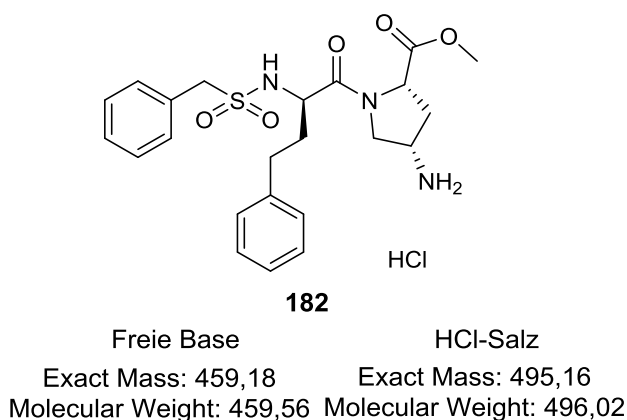
Molecular Weight: 485,56

1,00 g (1,86 mmol) Bzls-D-hPhe-Pro(4R-OMs)-MeO (**180**) wurden in 30 mL DMSO gelöst, mit 242 mg (3,72 mmol, 2.00 Äquiv.) Natriumazid versetzt und bei einer Badtemperatur von 90 °C für 3 h gerührt. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC)

wurde der Ansatz mit 50 mL EtOAc versetzt, 3 × neutral gewaschen, über NaSO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute : 657 mg (1,35 mmol; 72,6% der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 20,9 min (Start bei 40 % LM B).

Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH₂)-MeO × HCl (182**)^[201]**

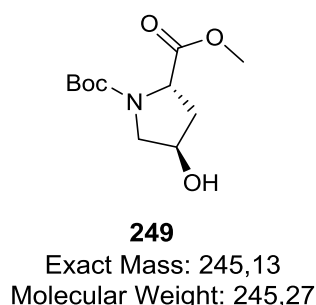


655 mg (1,35 mmol) Bzls-D-hPhe-Pro(4S-N₃)-MeO (**181**) wurden in 20 mL MeOH gelöst, mit 70 mg 10 % Pd/C versetzt und bei Normaldruck mit Wasserstoff über Nacht hydriert. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde der Ansatz filtriert, mit 10 mL 1N HCl versetzt und i.V. eingengt.

Ausbeute: 412 mg (0,83 mmol; 61,5 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 19,9 min (Start bei 20 % LM B).

MS gefunden m/z: 460,15 (M+H)⁺.

Boc-Pro(4R-OH)-MeO (249**)**



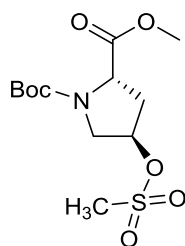
2,97 g (16,35 mmol) H-Pro(4R-OH)-MeO × HCl wurden in 10 mL Dioxan und 10 mL Wasser suspendiert und mit 10 mL 1 N NaOH versetzt. Nach Kühlung auf 0 °C wurden 7,14 g (32,70 mmol, 2.00 Äquiv.) Boc₂O hinzugefügt und 3 h bei RT gerührt. Das LM wurde i.V.

weitestgehend entfernt, der Rückstand mit 20 mL Wasser und 20 mL EtOAc aufgenommen und der pH-Wert der wässrigen Phase unter Eiskühlung mit 5 % KHSO₄ auf ca. 2 – 3 eingestellt. Die organische Phase wurde 2 × sauer und 2 × neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 1,92 g (7,83 mmol; 47,9 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 22,4 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 246,17 (M+H)⁺.

Boc-Pro(4R-OMs)-MeO (250)^[201]



250

Exact Mass: 323,10

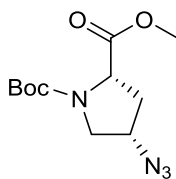
Molecular Weight: 323,36

1,82 g (7,42 mmol) Boc-Pro(4R-OH)-MeO (**249**) wurden in 60 mL trockenem DCM gelöst, der Ansatz auf 0 °C gekühlt und mit 2,08 mL (14,84 mmol, 2.00 Äquiv.) Triethylamin und 1,15 mL (14,84 mmol, 2.00 Äquiv.) Mes-Cl versetzt. Es wurde ca. 5 h bei RT gerührt und nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle per HPLC) das LM i.V. entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen und 3 × sauer, 1 × neutral, 3 × basisch und 3 × neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 2,13 g (6,59 mmol; 88,8 % der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 24,9 min (Start bei 20 % LM B).

MS gefunden m/z: 324,11 (M+H)⁺.

Boc-Pro(4S-N₃)-MeO (251)^[201]



251

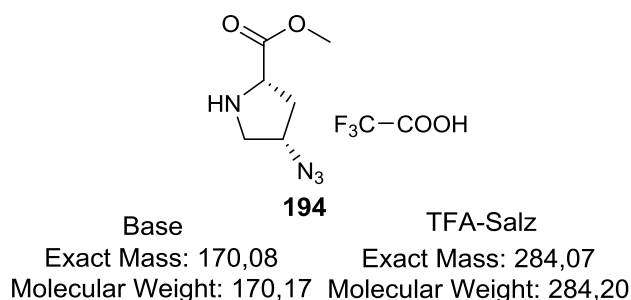
Exact Mass: 270,13

Molecular Weight: 270,29

2,00 g (6,19mmol) Boc-Pro(4S-OMs)-MeO (**250**) wurden in 15 mL DMSO gelöst, mit 805 mg (12,38 mmol, 2.00 Äquiv.) Natriumazid versetzt und bei einer Badtemperatur von 90 °C für 3 h gerührt. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde der Ansatz mit 50 mL EtOAc versetzt, mit H₂O und Brine gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i.V. eingengt.

Ausbeute : 1,43 g (5,29 mmol; 85,4 % der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 20,4 min (Start bei 30 % LM B).

H-Pro(4S-N₃)-MeO × TFA (**194**)^[202]

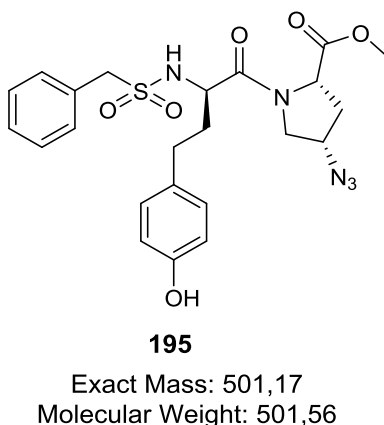


1,07 g (3,96 mmol) Boc-Pro(4S-N₃)-MeO (**251**) wurden mit 4 mL TFA und 12 mL DCM versetzt und der Ansatz für 90 min bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. eingengt, der Rückstand mit wenig Methanol gelöst und in 30 mL Diethylether eingetropft. Der ausgefallene Feststoff wurde zentrifugiert (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) und das Pellet i.V. getrocknet.

Ausbeute: 581 mg (2,04 mmol; 51,5 % der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 14,6 min (Start bei 20 % LM B).

MS gefunden m/z: 171,10 (M+H)⁺.

Bzls-D-hTyr-Pro(4S-N₃)-MeO (**195**)

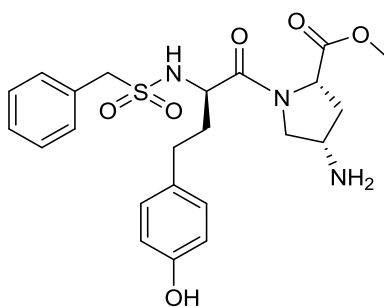


380 mg (1,09 mmol) Bzls-D-hTyr-OH (**193**) und 310 mg (1,09 mmol, 1.00 Äquiv.) H-Pro(4S-N₃)-OMe × TFA (**194**) wurden in 10 mL DMF gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und mit 482 mg BOP (1,09 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie 569 µL (3,27 mmol, 3.00 Äquiv.) DIPEA versetzt, 15 min unter Eiskühlung und weitere 3 h bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. eingengt, der Rückstand in einer Mischung aus EtOAc und 5 % KHSO₄ aufgenommen und 3 × sauer, 1 × neutral, 2 × basisch sowie 3 × neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 445 mg (0,89 mmol; 81,7 % der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 21,6 min (Start bei 30 % LM B).

MS gefunden m/z: 524,16 (M+Na)⁺.

Bzls-D-hTyr-Pro(4S-NH₂)-MeO (**196**)^[201]



196

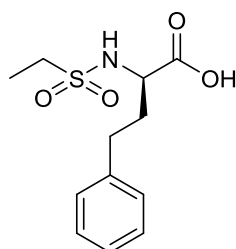
Exact Mass: 475,18

Molecular Weight: 475,56

445 mg (0,89 mmol) Bzls-D-hTyr-Pro(4S-N₃)-OMe (**195**) wurden in 20 mL MeOH gelöst, mit 50 mg 10 % Pd/C versetzt und mittels Wasserstoff über Nacht hydriert. Der Katalysator wurde mittels Filtration filtriert und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 277 mg (0,58 mmol; 66,7 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 13,5 min (Start bei 20 % LM B).

Ets-d-hPhe-OH (**252**)



252

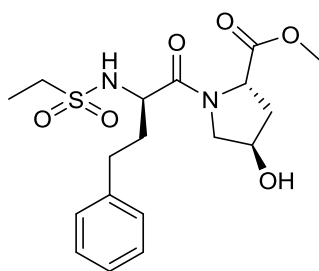
Exact Mass: 271,09

Molecular Weight: 271,33

955 mg (5,33 mmol) H-D-Homophenylalanin wurden in 10 mL getrocknetem DCM suspendiert, mit 1,49 mL (11,73 mmol, 2.20 Äquiv.) Trimethylsilylchlorid und 2,04 mL (11,73 mmol, 2.20 Äquiv.) DIPEA versetzt, für 1 h am Rückfluss gekocht, per Eisbad abgekühlt, mit 927 µl (5,33 mmol, 1.00 Äquiv.) DIPEA und 505 µL (5,33 mmol, 1.00 Äquiv.) Ethylsulfonylchlorid versetzt und bei RT gerührt. Nach nahezu vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde der Ansatz i.V. eingengt, mit H₂O und EtOAc versetzt, 3 × sauer und 3 × neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 705 mg (2,60 mmol; 48,7 % der Theorie), brauner Feststoff, HPLC 21,4 min (Start bei 20 % LM B)

Ets-D-hPhe-Pro(4R-OH)-OMe (253)



253

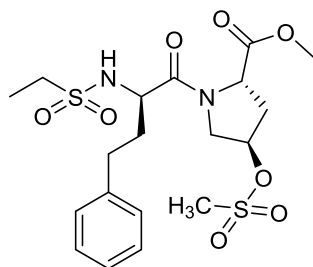
Exact Mass: 398,15

Molecular Weight: 398,47

705 mg (2,60 mmol) Ets-D-hPhe-OH (**252**) und 472 mg (2,60 mmol, 1.00 Äquiv.) H-Pro(4R-OH)-OMe × HCl wurden in 10 mL DMF gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt, mit 1,15 g BOP (2,60 mmol, 1.00 Äquiv.) und 905 µL (5,20 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA versetzt, 15 min unter Eiskühlung und 3 h bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. eingengt und der Rückstand in einer Mischung aus EtOAc und 5 % KHSO₄ aufgenommen. Die organische Phase wurde hintereinander 3 × sauer, 1 × neutral, 3 × basisch, 3 × neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 843 mg (2,12 mmol; 81,5 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 19,8 min (Start bei 20 % LM B).

Ets-D-hPhe-Pro(4R-OMs)-MeO (254)^[201]



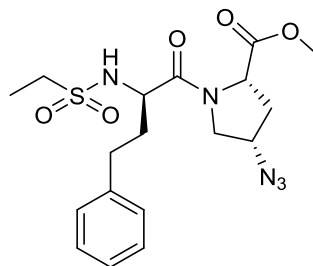
254

Exact Mass: 476,13
Molecular Weight: 476,56

843 g (2,12 mmol) Ets-D-hPhe-Pro(4R-OH)-MeO (**253**) wurden in 30 mL trockenem DCM gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 594 µL (4,24 mmol, 2.00 Äquiv.) Triethylamin sowie 328 µL (4,24 mmol, 2.00 Äquiv.) Mes-Cl versetzt. Der Ansatz wurde 8 h bei RT gerührt und anschließend das LM i.V. entfernt. Der Rückstand wurde in einer Mischung EtOAc und 5 % KHSO₄ aufgenommen und anschließend 3 × sauer, 1 × neutral, 3 × basisch und 3 × neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 705 mg (1,48 mmol; 69,8 % der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 27,4 min (Start bei 20 % LM B).

Ets-D-hPhe-Pro(4S-N₃)-MeO (255)^[201]



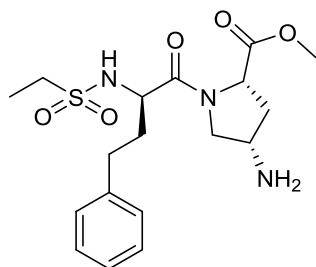
255

Exact Mass: 423,16
Molecular Weight: 423,49

Die Synthese der Zielverbindung **255** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **181** aus 705 mg (1,48 mmol) Ets-D-hPhe-Pro(4S-OMs)-MeO (**254**) und 192 mg (2,96 mmol, 2.00 Äquiv.) Natriumazid in 30 mL DMSO.

Ausbeute : 476 mg (1,12 mmol; 75,7 % der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 32,1 min (Start bei 20 % LM B).

Ets-D-hPhe-Pro(4S-NH₂)-OMe (**256**)^[201]



256

Exact Mass: 397,17

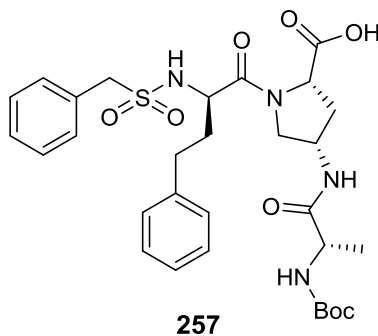
Molecular Weight: 397,49

476 mg (1,12 mmol) Ets-D-hPhe-Pro(4S-N₃)-MeO (**255**) wurden in 20 mL MeOH gelöst, mit 50 mg 10 % Pd/C versetzt und bei Normaldruck mit Wasserstoff über Nacht hydriert. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde der Ansatz filtriert und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 301 mg (0,76 mmol; 67,9 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 20,9 min (Start bei 10 % LM B).

5.3.16 Bausteine des Typs P4-P3-Pro(4S-NH(R))-OH

Bzls-D-hPhe-Pro(4S-((Boc)Ala-NH)-OH (**257**))



257

Exact Mass: 616,26

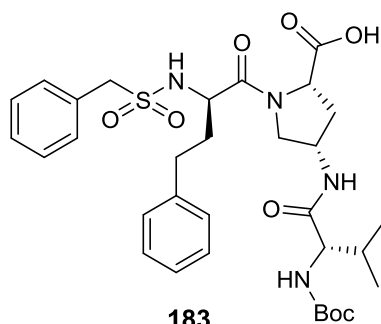
Molecular Weight: 616,73

101 mg (0,20 mmol) Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH₂)-OMe × HCl (**182**) und 38 mg (0,20 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-Ala-OH wurden in 20 mL DMF gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und mit 88 mg BOP (0,20 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie 104 µL (0,60 mmol, 3.00 Äquiv.) DIPEA versetzt. Der Ansatz wurde anschließend 15 min unter Eiskühlung und 4 h bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. entfernt, der Rückstand in einer Mischung aus EtOAc und 5 % KHSO₄ aufgenommen, sowie 3 × sauer, 1 × neutral, 3 × basisch und 3 × neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt. Der Rückstand (HPLC 29,1 min, Start bei 30 % LM B) wurde mit 1,5 mL Dioxan und 1,5 mL 1N NaOH versetzt und 60 min bei RT gerührt. Der

Ansatz wurde in 10 mL EtOAc und 10 mL 5 % KHSO₄ gegeben und die organische Phase 2 × sauer und 2 × neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. entfernt.

Ausbeute: 68 mg (0,11 mmol; 55,0 % der Theorie; 0,10 mmol), farbloser Feststoff, HPLC 24,5 min (Start bei 30 % LM B).

Bzls-D-hPhe-Pro(4S-((Boc)Val-NH)-OH (**183**)



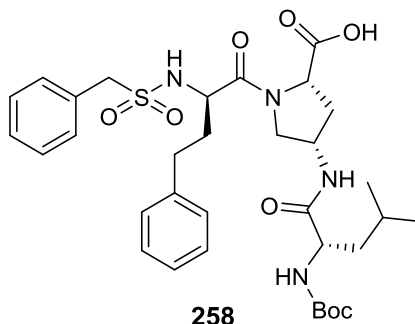
Exact Mass: 644,29
Molecular Weight: 644,78

Die Synthese der Zielverbindung **183** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **257** aus 69 mg (0,14 mmol) Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH₂)-OMe × HCl (**182**) und 30 mg (0,14 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-Val-OH in 10 mL DMF.

HPLC der Esterzwischenstufe = 24,8 min (Start bei 40 % LM B).

Ausbeute: 51 mg (0,08 mmol; 57,1 % der Theorie), farbloser Feststoff, HPLC 29,9 min (Start bei 30 % LM B).

Bzls-D-hPhe-Pro(4S-((Boc)Leu-NH)-OH (**258**)



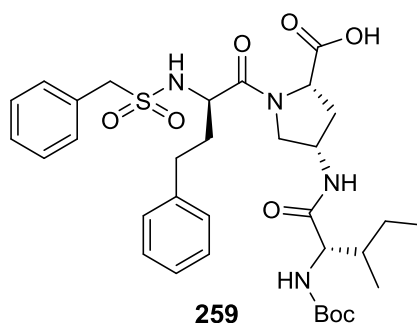
Exact Mass: 658,30
Molecular Weight: 658,81

Die Synthese der Zielverbindung **258** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **257** aus 86 mg (0,17 mmol) Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH₂)-OMe × HCl (**182**) und 42 mg (0,17 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-Leu-OH×H₂O in 10 mL DMF.

HPLC der Esterzwischenstufe = 27,5 min (Start bei 40 % LM B).

Ausbeute: 77 mg (0,12 mmol; 70,6 % der Theorie), farbloser Feststoff, HPLC = 22,6 min (Start bei 40 % LM B).

Bzls-D-hPhe-Pro(4S-((Boc)Ile-NH)-OH Pro (**259**)



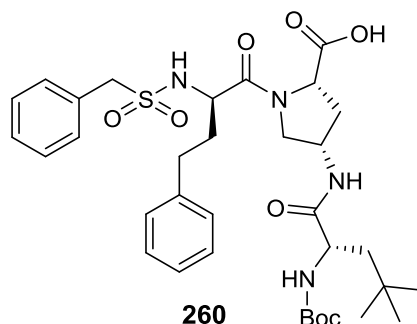
Exact Mass: 658,30
Molecular Weight: 658,81

Die Synthese der Zielverbindung **259** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **257** aus 88 mg (0,18 mmol) Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH₂)-OMe × HCl (**182**) und 42 mg (0,18 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-Ile-OH in 10 mL DMF.

HPLC der Esterzwischenstufe = 27,5 min (Start bei 40 % LM B).

Ausbeute: 92 mg (0,14 mmol; 77,8 % der Theorie), farbloser Feststoff, HPLC 23,1 min (Start bei 40 % LM B).

Bzls-D-hPhe-Pro(4S-((Boc)tButAla-NH)-OH (**260**)



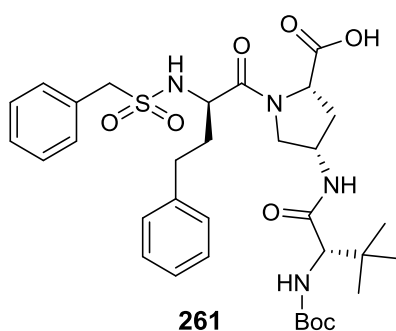
Exact Mass: 672,32
Molecular Weight: 672,84

Die Synthese der Zielverbindung **260** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **257** aus 74 mg (0,15 mmol) Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH₂)-OMe × HCl (**182**) und 37 mg (0,15 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-tButylAla-OH in 10 mL DMF.

HPLC der Esterzwischenstufe = 29,9 min (Start bei 40 % LM B).

Ausbeute: 44 mg (0,07 mmol; 46,7 % der Theorie), farbloser Feststoff, HPLC , = 25,1 min (Start bei 40 % LM B).

Bzls-d-hPhe-Pro(4S-((Boc)Tle-NH)-OH (**261**)



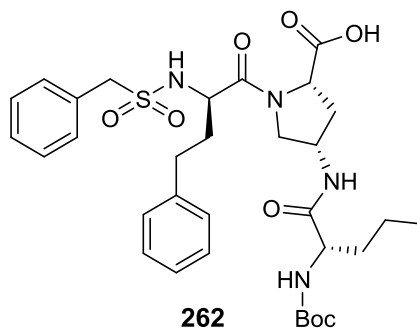
Exact Mass: 658,30
Molecular Weight: 658,81

Die Synthese der Zielverbindung **261** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **257** aus 121 mg (0,24 mmol) Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH₂)-OMe × HCl (**182**) und 56 mg (0,24 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-Tle-OH in 10 mL DMF.

HPLC der Esterzwischenstufe = 27,3 min (Start bei 40 % LM B).

Ausbeute: 123 mg (0,19 mmol; 79,2 % der Theorie), farbloser Feststoff, HPLC 23,2 min (Start bei 40 % LM B).

Bzls-d-hPhe-Pro(4S-((Boc)Nva-NH)-OH (262)



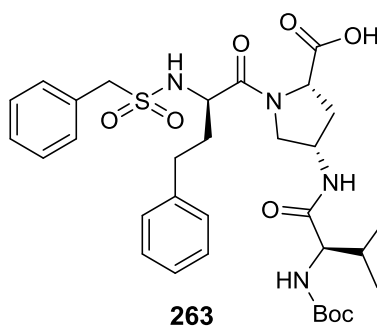
Exact Mass: 644,29
Molecular Weight: 644,78

Die Synthese der Zielverbindung **262** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **257** aus 89 mg (0,18 mmol) Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH₂)-OMe × HCl (**182**) und 39 mg (0,18 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-Nva-OH in 10 mL DMF.

HPLC der Esterzwischenstufe = 24,9 min (Start bei 40 % LM B).

Ausbeute: 89 mg (0,14 mmol; 77,8 % der Theorie), farbloser Feststoff, HPLC 19,9 min (Start bei 40 % LM B).

Bzls-D-hPhe-Pro(4S-((Boc)DVal-NH)-OH (263)



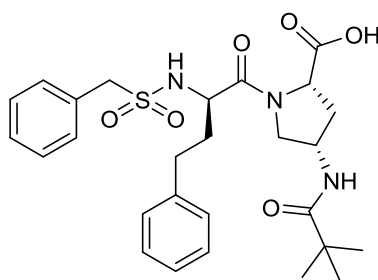
Exact Mass: 644,29
Molecular Weight: 644,78

Die Synthese der Zielverbindung **263** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **257** aus 179 mg (0,36 mmol) Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH₂)-OMe × HCl (**182**) und 78 mg (0,36 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-DVal-OH in 10 mL DMF.

HPLC der Esterzwischenstufe = 24,7 min (Start bei 40 % LM B).

Ausbeute: 160 mg (0,25 mmol; 69,4 % der Theorie), farbloser Feststoff, HPLC 20,0 min (Start bei 40 % LM B).

Bzls-D-hPhe-Pro(4S-Pivaloyl)-OH (264)



264

Exact Mass: 57,07

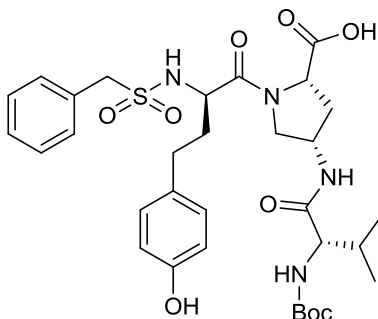
Molecular Weight: 57,12

Die Synthese der Zielverbindung **264** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **157** aus 104 mg (0,21 mmol) Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH₂)-OMe × HCl (**182**) und 21 mg (0,21 mmol, 1.00 Äquiv.) Pivalinsäure in 10 mL DMF.

HPLC der Esterzwischenstufe = 19,1 min (Start bei 40 % LM B).

Ausbeute: 107 mg (0,20 mmol; 95,2 % der Theorie), farbloser Feststoff, HPLC 15,6 min (Start bei 40 % LM B).

Bzls-d-hTyr- Pro(4S-((Boc)Val-NH)-OH (197)



197

Exact Mass: 660,28

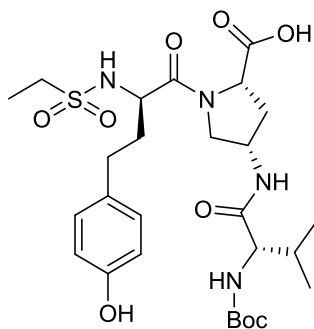
Molecular Weight: 660,78

Die Synthese der Zielverbindung **197** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **257** aus 124 mg (0,26 mmol) Bzls-D-hTyr-Pro(4S-NH₂)-OMe (**196**) und 56 mg (0,26 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-Val-OH in 10 mL DMF.

HPLC der Esterzwischenstufe = 26,1 min (Start bei 30 % LM B).

Ausbeute: 119 mg (0,18 mmol; 69,2 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 21,6 min (Start bei 30 % LM B)

Ets-d-hTyr-Pro(4S-((Boc)Val-NH)-OH (265)



265

Exact Mass: 598,27

Molecular Weight: 598,71

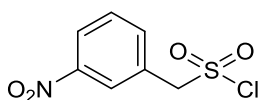
Die Synthese der Zielverbindung **265** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **257** aus 302 mg (0,76 mmol) Ets-d-hTyr-Pro(4S-NH₂)-MeO (**256**) und 165 mg (0,76 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-Val-OH in 10 mL DMF.

HPLC der Esterzwischenstufe = 26,5 min (Start bei 30 % LM B).

Ausbeute: 150 mg (0,25 mmol; 32,8 % der Theorie), farbloser Feststoff, HPLC 22,8 min (Start bei 30 % LM B).

5.3.17 Bausteine zur Darstellung eines zyklischen Inhibitors

3-Nitrobenzylsulfonylchlorid (**266**)^[203]



266

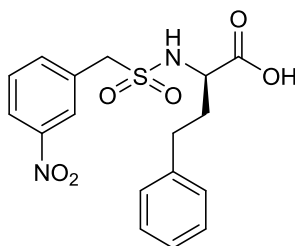
Exact Mass: 234,97

Molecular Weight: 235,64

2,99 g (12,50 mmol) 3-Nitrobenzylsulfonsäure-Natriumsalz wurden mit 17 mL POCl₃ angefeuchtet. Der Ansatz wurde mit 2,89 g (13,88 mmol, 1.11 Äquiv.), PCl₅ versetzt und 15 min unter Eiskühlung und 3 h bei 80 °C Badtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gegossen und 30 min kräftig gerührt. Der gebildete Feststoff wurde abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und i.V. getrocknet.

Ausbeute: 2,69 g (11,4 mmol; 91,2% der Theorie), heller Feststoff.

3-NO₂-Bzls-D-hPhe-OH (**267**)



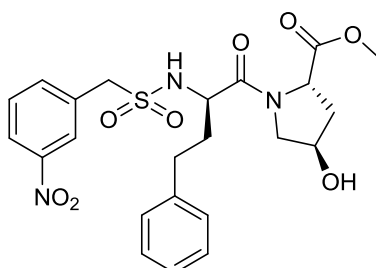
267

Exact Mass: 378,09
Molecular Weight: 378,40

Die Synthese der Zielverbindung **267** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **151** aus 1,78 g (9,12 mmol) H-D-Homophenylalanin und 2,15 g (9,12 mmol, 1.00 Äquiv.) 3-Nitrobenzylsulfonylchlorid (**266**).

Ausbeute: 2,85 g (7,53 mmol; 82,5% der Theorie), heller Feststoff, HPLC 23,2 min (Start bei 30 % LM B).

3-NO₂-Bzls-D-hPhe-Pro(4-R-OH)-MeO (**268**)



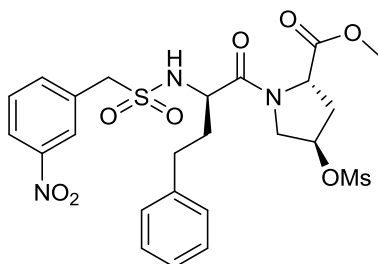
268

Exact Mass: 505,15
Molecular Weight: 505,54

Die Synthese der Zielverbindung **268** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **179** aus 2,74 g (7,24 mmol) 3-Nitrobzls-D-hPhe-OH (**267**) und 1,31 g (7,24 mmol, 1.00 Äquiv.) 4R-Hyp-MeO × HCl in 10 mL DMF.

Ausbeute: 2,92 g (5,78 mmol; 79,7 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 21,6 min (Start bei 30 % LM B).

3-NO₂-Bzls-D-hPhe-Pro(4-R-OH)-OMs (269)^[201]



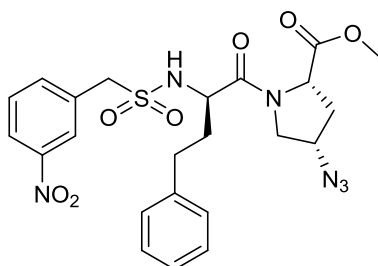
269

Exact Mass: 583,13

Molecular Weight: 583,63

Die Synthese der Zielverbindung **269** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **180** aus 2,9 g (5,74 mmol) 3-Nitrobzls-D-hPhe-Pro(4-R-OH)-MeO (**268**) unter Verwendung von 889 µL (11,48 mmol, 2.00 Äquiv.) Triethylamin und 1,99 mL (11,48 mmol, 2.00 Äquiv.) Mes-Cl in 30 mL trockenem DCM.

3-NO₂-D-hPhe-Pro(4-S-N₃)-OMe (270)^[201]



270

Exact Mass: 530,16

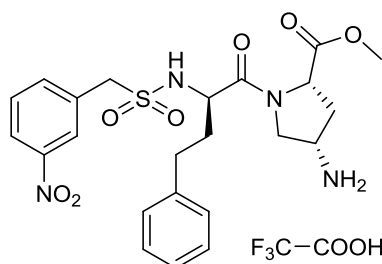
Molecular Weight: 530,56

Die Synthese der Zielverbindung **270** erfolgte analog der Vorschrift für das Intermediat **181** aus 3,00 g (5,14 mmol) 3-NO₂-Bzls-D-hPhe-Pro(4S-N₃)-MeO (**269**) und 668 mg (10,28 mmol, 2.00 Äquiv.) Natriumazid in 30 mL DMSO.

Ausbeute: 2,20 g (4,15 mmol; 80,7 % der Theorie), bräunlicher Feststoff, HPLC 31,2 min (Start bei 30 % LM B).

MS gefunden m/z: 548,10 (M+NH₄)⁺.

3-NO₂-D-hPhe-Pro(4-S-NH₂)-MeO × TFA (**200**)^[204]



200

Freie Base

TFA-Salz

Exact Mass: 504,17

Exact Mass: 618,16

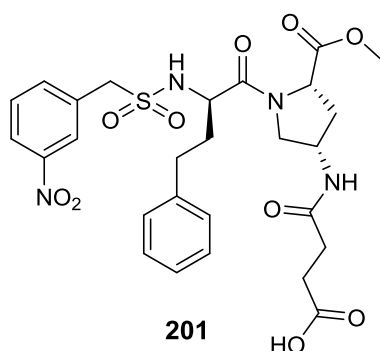
Molecular Weight: 504,56 Molecular Weight: 618,58

711 mg (1,34 mmol) 3-NO₂-Bzls-D-hPhe-Pro(4-S-N₃)-MeO (**270**) wurden in 18 mL THF gelöst. Zum auf 0 °C gekühlten Ansatz wurden tropfenweise 331 µL (1,34 mmol, 1.00 Äquiv.) Tributylphosphin gegeben. Der Ansatz wurde für 3 h bei RT gerührt und nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) i.V. eingengt. Der Rückstand wurde in 15 mL EtOAc aufgenommen, 3 × basisch und 3 × neutral gewaschen und die wässrige Phase 2 × mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das LM i.V. teilweise eingengt und aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 265mg (0,43 mmol; 32,1 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 32,1 min (Start bei 10 % LM B)

MS gefunden m/z: 505,13 (M+H)⁺.

3-NO₂-Bzls-D-hPhe-Pro(S-4-NH(Suc))- OMe (**201**)



201

Exact Mass: 604,18

Molecular Weight: 604,63

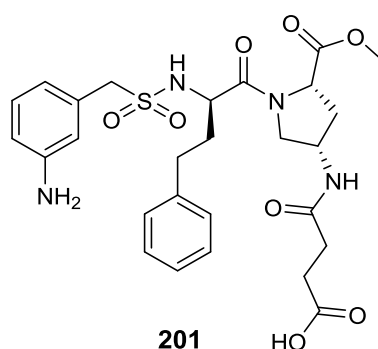
108 mg (0,17 mmol) 3-NO₂-Bzls-D-hPhe-Pro(4-S-NH₂)-MeO × TFA (**200**) wurden in 5 mL DMF gelöst und bei RT mit 30 µL (0,17 mmol, 1.00 Äquiv.) DIPEA und 30 µL (0,17 mmol, 1.00 Äquiv.) Bernsteinsäureanhydrid versetzt. Der Ansatz wurde 2 h bei RT gerührt und

anschließend das LM i.V. entfernt. Der Rückstand wurde mit einer Mischung aus EtOAc und 5 % KHSO₄-Lösung aufgenommen, 3 × sauer und 3 × neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 95 mg (0,16 mmol; 94,1 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 28,7 min (Start bei 20 % LM B).

MS gefunden m/z: 622,36 (M+NH₄)⁺.

3-NH₂-Bzls-D-hPhe-Pro(4-S-NH(Suc))MeO (**202**)



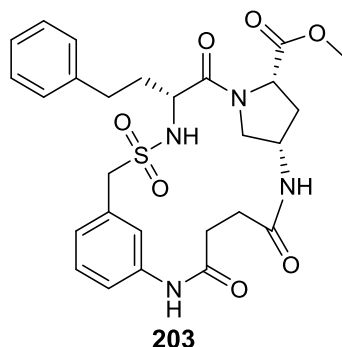
Exact Mass: 574,21
Molecular Weight: 574,65

95 mg (0,16 mmol) 3-NO₂-Bzls-D-hPhe-Pro(4-S-Amido(4succ))-MeO (**201**) wurden in 10 mL MeOH gelöst, mit 15 mg 10 % Pd/C versetzt und bei Normaldruck über Nacht mittels Wasserstoff hydriert.

Der Katalysator wurde durch Filtration entfernt und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 63 mg (0,11 mmol; 68,8 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 23,1 min (Start bei 10 % LM B).

3-NH-Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH-CO-(CH₂)₂-CO)-MeO (203)



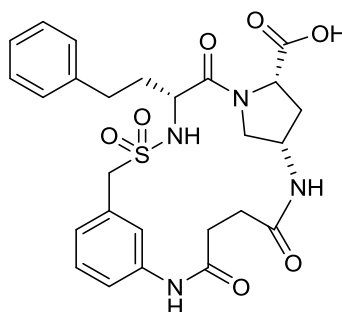
Exact Mass: 556,20
Molecular Weight: 556,63

63 mg (0,11 mmol) 3-NH₂-Bzls-D-hPhe-Pro(4-S-NH(Suc))MeO (**202**) wurden in 60 mL DMF gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und mit 49 mg BOP (0,11 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie 38 µL (0,22 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA versetzt, 30 min unter Eiskühlung und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde das LM i.V. entfernt und der Rückstand in ca. 10 mL einer Mischung aus EtOAc und 5 % KHSO₄ aufgenommen, sowie 2 × sauer, 1 × neutral, 2 × basisch und 2 × neutral gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. entfernt.

Ausbeute: 56 mg (0,10 mmol; 91,0 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC = 20,0 min (Start bei 20 % LM B).

MS gefunden m/z: 579,32 (M+Na)⁺.

3-NH-Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH-CO-(CH₂)₂-CO)-OH (204)



Exact Mass: 542,18
Molecular Weight: 542,61

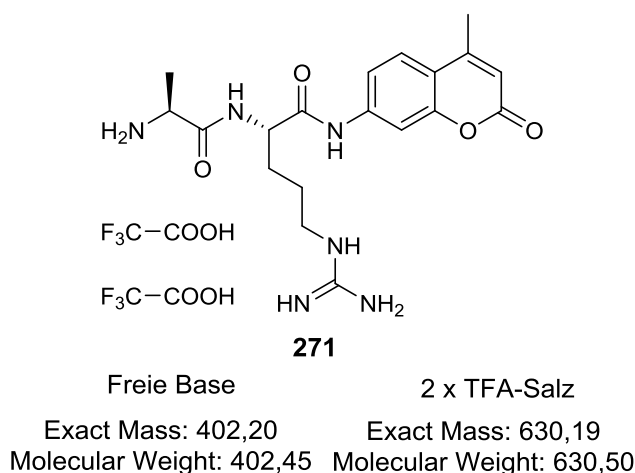
56 mg (0,10 mmol) c[3-NH-Bzls-D-hPhe-Pro(4S-NH-CO-(CH₂)₂-CO)]-MeO (**203**) wurden in 1 mL Dioxan gelöst und mit 1 mL 1M NaOH versetzt. Der Ansatz wurde 2 h bei RT gerührt und anschließend das LM i.V. entfernt. Der Rückstand wurde zu einer Mischung aus EtOAc und 5 % KHSO₄ gegossen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das LM i.V. eingengt.

Ausbeute: 39 mg (0,07 mmol; 70 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 28,1 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 565,39 (M+Na)⁺.

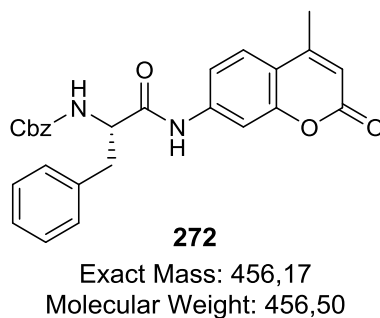
5.3.18 Synthese der AMC-Bausteine

H-Ala-Arg-AMC × 2 TFA (**271**)



585 mg (1,45 mmol) H-Arg-AMC ×2 HCl und 273 mg (1,45 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-Ala-OH wurden in 10 mL DMF gelöst und nach Kühlung des Ansatzes auf 0 °C mit 640 mg BOP (1,45 mmol, 1.00 Äquiv.) und 757 µL (4,35 mmol, 3.00 Äquiv.) DIPEA versetzt. Nach fast vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde der Ansatz eingengt, mit 20 mL TFA versetzt und 1 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde in ausreichend Diethylether (in 50 mL Falcon-Tubes) eingetroppt und das ausgefallene Produkt durch Zentrifugation isoliert. Der Überstand wurde abdekantiert, der Feststoff resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der erhaltene Feststoff wurde i.V. getrocknet.

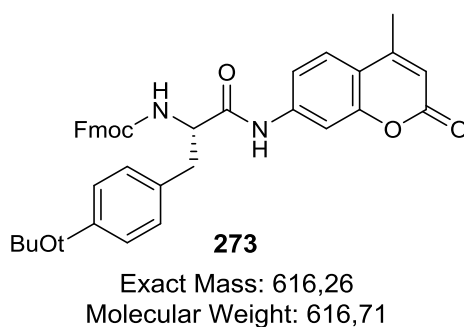
Ausbeute: 777 mg (1,23 mmol; 85,8 % der Theorie), weißes Pulver, HPLC 13,0 min (Start bei 10 % LM B).

Cbz-Phe-AMC (272)^[205-206]

3,01 g (10,06 mmol) Cbz-Phe-OH wurden in 30 mL Pyridin gelöst, mit 1,96 g (11,14 mmol, 1.11 Äquiv.) Aminomethylcoumarin versetzt, auf -10 °C gekühlt und tropfenweise innerhalb von 10 min mit 1,11 mL (12,16 mmol, 1.21 Äquiv.) POCl₃, gelöst in 5 mL Pyridin, versetzt. Der Ansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und 3h bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt und anschließend auf Eis gegossen. Das aufgetaute Eiswasser wurde 3 × mit EtOAc extrahiert und die organische Phase 3 × basisch und 3 × neutral gewaschen sowie über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde i.V. eingengt.

Ausbeute: 3,16 g (6,92 mmol; 68,9 % der Theorie), gelblicher Feststoff, HPLC 22,2 min (Start bei 30 % LM B).

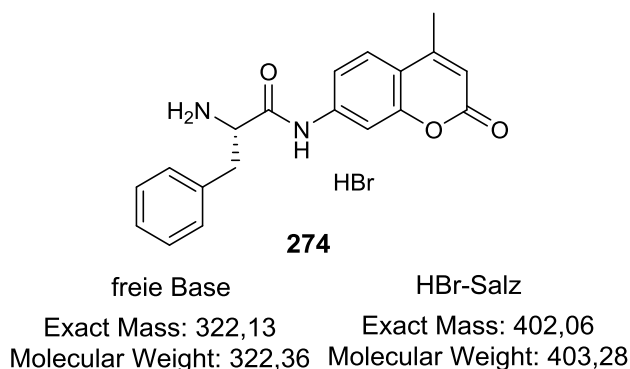
MS gefunden m/z: 457,10 (M+H)⁺.

Fmoc-Tyr(OtBu)-AMC (273)^[205-206]

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für Verbindung **272** ausgehend von 2,84 g (6,18 mmol) Fmoc-Tyr(OtBu)-OH und 1,20 g (6,86 mmol, 1.11 Äquiv.) AMC in 30 mL trockenem Pyridin.

Ausbeute: 3,62 g (5,87 mmol; 94,9 % der Theorie), gelblicher Feststoff, HPLC 36,6 min (Start bei 40 % LM B).

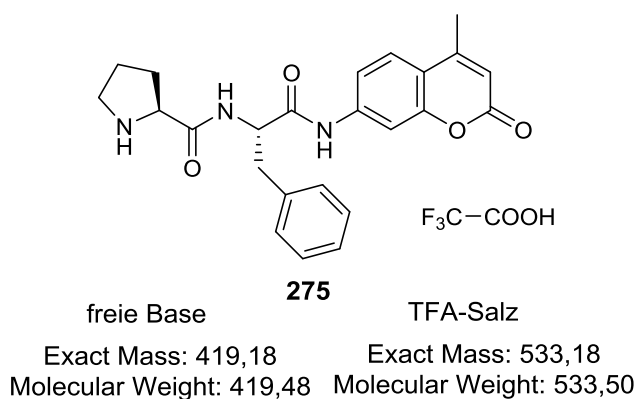
H-Phe-AMC × HBr (**274**)^[207]



1,48 g (3,24 mmol) Z-Phe-AMC wurden in 20 mL 32 % HBr/Eisessig gelöst und für 1 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde in 80 mL Ether eingetropft und zentrifugiert (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm). Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der nach erneutem Dekantieren zurückbleibende Feststoff wurde i.V. getrocknet.

Ausbeute: 1,04 g (2,58 mmol; 79,6 % der Theorie), heller Feststoff, HPLC 23,5 min (Start bei 10 % LM B).

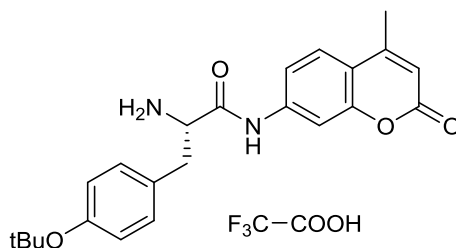
H-Pro-Phe-AMC × TFA (**275**)



775 mg (1,92 mmol) H-Phe-AMC × HBr (**274**) und 413 mg (1,92 mmol, 1.00 Äquiv.) Boc-Pro-OH wurden in 10 mL DMF gelöst. Nach Kühlung des Ansatzes auf 0 °C wurden 849 mg BOP (1,92 mmol, 1.00 Äquiv.) und 1,00 mL (5,76 mmol, 3.00 Äquiv.) DIPEA hinzugefügt. Nach fast vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde der Ansatz i.V. eingeeengt, der Rückstand mit 5 mL TFA versetzt und für 1 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde in 40 mL Ether eingetropft und der ausgefallene Feststoff durch Zentrifugation (5 min, 4 °C, 5000 rpm) isoliert, in 40 mL Ether resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der erhaltene Feststoff wurde i.V. getrocknet.

Ausbeute: 920 mg (1,72 mmol; 89,6 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 16,4 min (Start bei 20 % LM B).

H-Tyr(OtBu)-AMC (276)



276

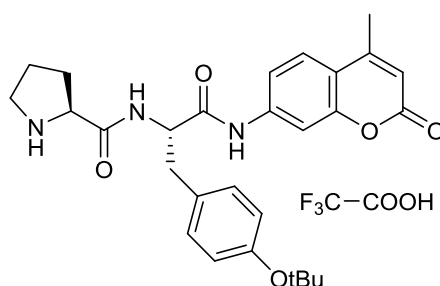
Freie Base	TFA-Salz
Exact Mass: 394,19	Exact Mass: 508,18
Molecular Weight: 394,47	Molecular Weight: 508,49

1,52 g (2,46 mmol) Fmoc-Tyr(OtBu)-AMC (**273**) wurden in 15 mL 10 % Diethylamin in DMF gelöst und der Ansatz 1 h bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. entfernt und der Rückstand vorsichtig unter Eiskühlung mit HCOOH auf pH 3 angesäuert und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen wurden i.V. teilweise eingengt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 327 mg (0,64 mmol; 26,0 % der Theorie), gelber Feststoff, HPLC 20,9 min (Start bei 20 % LM B).

MS gefunden m/z: 395,12 (M+H)⁺.

H-Pro-Tyr(OtBu)-AMC × TFA (121)



121

Base	TFA-Salz
Exact Mass: 491,24	Exact Mass: 605,23
Molecular Weight: 491,59	Molecular Weight: 605,61

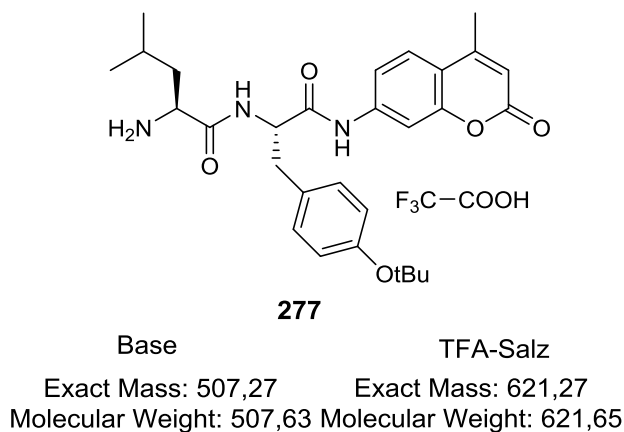
43 mg (0,08 mmol) H-Tyr(tBu)-AMC × TFA (**276**) und 27 mg (0,08 mmol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-Pro-OH wurden in 5 mL DMF gelöst. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und mit 35 mg BOP

(0,08 mmol, 1.00 Äquiv.) sowie 28 µL (0,16 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA versetzt und 15 min unter Eiskühlung und 5 h bei RT gerührt (Reaktionskontrolle mittels HPLC). Der eingeeengte Ansatz wurde in 5 mL 10 % Diethylamin gelöst, 1 h bei RT gerührt und das LM i.V. weitestgehend eingeeengt. Der Rückstand wurde vorsichtig unter Eiskühlung mit HCOOH auf pH 3 angesäuert und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt, das LM i.V. teilweise eingeeengt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 34 mg (0,06 mmol; 75,0% der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 23,3 min (Start bei 20 % LM B).

MS gefunden m/z: 492,15 (M+H)⁺.

H-Leu-Tyr(OtBu)-AMC × TFA (**277**)

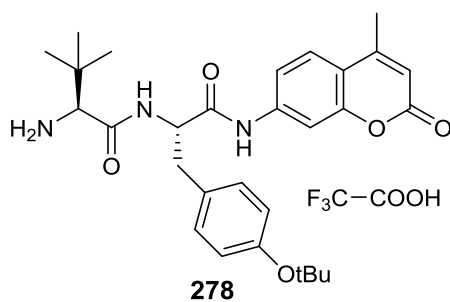


Die Synthese der Zielverbindung **277** erfolgte analog der Beschreibung für das Intermediat **121** aus 32 mg (0,06 mmol) H-Tyr(OtBu)-AMC × TFA (**276**) und 21 mg (0,06 mmol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-Leu-OH in 5 mL DMF.

Ausbeute: 28 mg (0,05 mmol; 83,3 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 26,3 min (Start bei 20 % LM B).

MS gefunden m/z: 508,20 (M+H)⁺.

H-Tle-Tyr(OtBu)-AMC × TFA (**278**)



Base	TFA-Salz
Exact Mass: 507,27	Exact Mass: 621,27
Molecular Weight: 507,63	Molecular Weight: 621,65

Die Synthese der Zielverbindung **278** erfolgte analog der Beschreibung für das Intermediat **121** aus 65 mg (0,13 mmol) H-Tyr(OtBu)-AMC × TFA (**276**) und 46 mg (0,06 mmol, 1.00 Äquiv.) Fmoc-Tle-OH in 5 mL DMF gelöst.

Ausbeute: 48 mg (0,08 mmol; 61,5 % der Theorie), weißer Feststoff, HPLC 24,9 min (Start bei 20 % LM B).

MS gefunden m/z: 508,21 (M+H)⁺.

5.4 Synthese der Inhibitoren

5.4.1 Inhibitoren der Matriptase

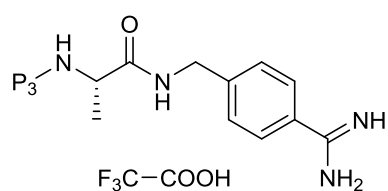
5.4.1.1 Synthese der Inhibitoren des Typs H-P3-Ala-Amba

1.00 Äquiv. der Boc-geschützten, racemischen, P3-Aminosäure (ca. 0,1 mmol) wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 1.00 Äquiv. H-Ala-Amba \times 2 HCl (**85**), 1.00 Äquiv. BOP und 2.00 Äquiv. DIPEA versetzt.

Der Reaktionsansatz wurde bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt und i.V. eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 5 mL TFA versetzt, für 1 h bei RT gerührt und in ca. 40 mL Ether getropft. Das ausgefallene Rohprodukt wurde durch Zentrifugation (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) isoliert, der Rückstand in ca. 40 mL Diethylether resuspendiert und der Ansatz erneut zentrifugiert. Der erhaltene Feststoff mit den beiden Diastereomeren wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das Lösemittel i. V. teilweise eingeeengt und die beiden Produkte aus Wasser lyophilisiert.

Auf diese Weise konnten die beiden Diastereomere voneinander getrennt werden. Die analytischen Daten der erhaltenen Inhibitoren sind in Tabelle 35 zusammengefasst.

Tabelle 35: Übersicht der substratanalogen Inhibitoren mit Alanin als P3-Rest (Start HPLC bei 10 % LM B).



Nr.	P3-Aminosäure	MS ber.	MS gefunden	HPLC min
86		415,18 (M)	416,23 (M+H) ⁺	16,5
87		415,18 (M)	416,23 (M+H) ⁺	20,3
89		415,18 (M)	416,10 (M+H) ⁺	18,4
92		449,14 (M)	450,00 (M+H) ⁺	23,4
93		415,18 (M)	416,11 (M+H) ⁺	19,5
95		411,23 (M)	412,17 (M+H) ⁺	15,8
98		449,14 (M)	450,03 (M+H) ⁺	19,0
99		411,23 (M)	412,24 (M+H) ⁺	12,8
101		415,18 (M)	416,17 (M+H) ⁺	14,7
103		415,18 (M)	416,13 (M+H) ⁺	16,0
109		395,23 (M)	396,19 (M+H) ⁺	14,6
110		395,23 (M)	396,21 (M+H) ⁺	17,5

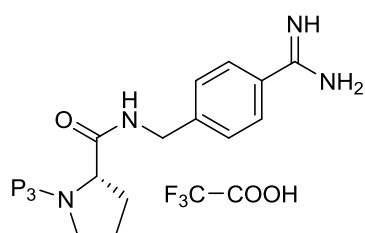
5.4.1.2 Synthese der Inhibitoren des Typs H-P3-Pro-Amba

1.00 Äquiv. der Boc-geschützten, racemischen, P3-Aminosäure (ca. 0,1 mmol) wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 1.00 Äquiv. H-Pro-Amba \times 2 HCl (**88**), 1.00 Äquiv. BOP und 2.00 Äquiv. DIPEA versetzt.

Der Reaktionsansatz wurde bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt und i.V. eingengt. Der Rückstand wurde mit 5 mL TFA versetzt, für 1 h bei RT gerührt und in ca. 40 mL Ether getropft. Das ausgefallene Rohprodukt wurde durch Zentrifugation (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) isoliert, der Rückstand in ca. 40 mL Diethylether resuspendiert und der Ansatz erneut zentrifugiert. Der erhaltene Feststoff mit den beiden Diastereomeren wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das Lösemittel i. V. teilweise eingengt und die beiden Produkte aus Wasser lyophilisiert.

Auf diese Weise konnten die beiden Diastereomere voneinander getrennt werden. Die analytischen Daten der erhaltenen Inhibitoren sind in Tabelle 36 zusammengefasst.

Tabelle 36: Übersicht der substratanalogen Inhibitoren mit Prolin als P3-Rest Start HPLC bei 10 % LM B).



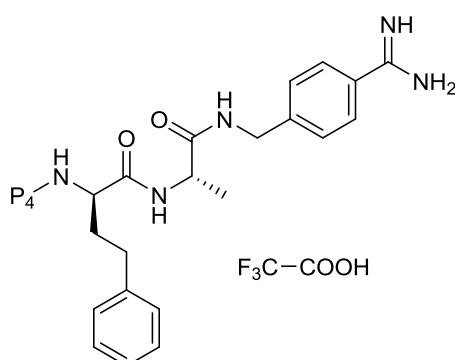
Nr.	P3-Aminosäure	MS ber.	MS gefunden	HPLC min
90		441,19 (M)	442,21 (M+H) ⁺	21,6
91		441,19 (M)	442,21 (M+H) ⁺	19,8
94		475,15 (M)	476,22 (M+H) ⁺	22,7
96		437,24 (M)	437,90 (M+H) ⁺	17,1
97		441,19 (M)	442,13 (M+H) ⁺	20,2
100		441,19 (M)	442,14 (M+H) ⁺	18,7
102		437,24 (M)	437,90 (M+H) ⁺	15,8
104		475,15 (M)	476,19 (M+H) ⁺	20,6
105		441,19 (M)	442,24 (M+H) ⁺	18,0
106		441,19 (M)	442,27 (M+H) ⁺	20,0
111		421,25 (M)	422,22 (M+H) ⁺	17,0
112		421,25 (M)	422,28 (M+H) ⁺	18,0

5.4.1.3 Synthese substratanaloger Inhibitoren mit P4-Rest

1.00 Äquiv. des jeweiligen P4-D-hPhe-Bausteines (ca. 0,2 mmol) wurde in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit jeweils 1.00 Äquiv. H-Ala-Amba \times 2 HCL (**85**), 1.00 Äquiv. BOP sowie 2.00 Äquiv. DIPEA versetzt. Der Ansatz wurde bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt, das LM i.V. entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt.

Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt, das Lösemittel i.V. teilweise eingengt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert. Die analytischen Daten der erhaltenen Inhibitoren sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

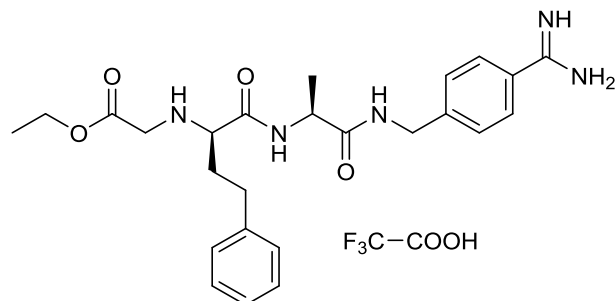
Tabelle 37: Analytische Daten der dargestellten Inhibitoren mit P4-Rest. Start HPLC bei 10 % LM B.



Nr.	P4-P3-Segment	MS ber.	MS gefunden	HPLC min
113	Butylsulfonyl-D-hPhe	501,24 (M)	502,19 (M+H) ⁺	29,7
114	Mes-D-hPhe	459,19 (M)	460,14 (M+H) ⁺	22,0

5.4.1.4 Synthese von H-N(Ethoxycarbonylmethyl)-D-hPhe-Ala-4-Amba

Bzls-D/L-hAla(4Pyr)-Ala-4-Amba (117)



117

freie Base

TFA-Salz

Exact Mass: 467,25

Exact Mass: 581,25

Molecular Weight: 467,57

Molecular Weight: 581,59

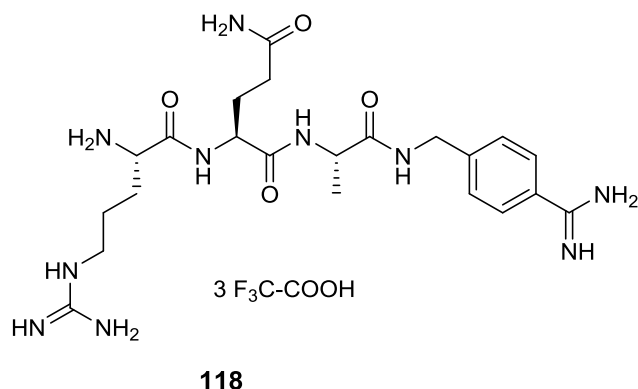
97 mg (0,29 mmol, 1.00 Äquiv.) H-N(Ethoxycarbonylmethyl)-D-hPhe-Ala-OH (**116**) wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 109 mg (0,29 mmol, 1.00 Äquiv.) H-Amba \times 2 TFA, 128 mg (0,29 mmol, 1.00 Äquiv.) BOP und 151 μL (0,87 mmol, 3.00 Äquiv.) DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt und i.V. eingengt. Der erhaltene Feststoff wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das Lösemittel i. V. teilweise eingengt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 52 mg (0,09 mmol; 31,0 % der Theorie), weißes Lyophilisat, HPLC 18,5 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z : 468,11 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

5.4.1.5 Synthese des Hemmstoffs H-Arg-Gln-Ala-4-Amba

H-Arg-Gln-Ala-4-Amba (118)



Freie Base	3 x TFA-Salz
Exact Mass: 504,29	Exact Mass: 846,27
Molecular Weight: 504,60	Molecular Weight: 846,67

Der Inhibitor wurde durch eine Kombination aus Festphasenpeptidsynthese an einem 2-Chlortritylchlorid-Harz und Ankupplung des P1-Restes in Lösung hergestellt.

Harzbeladung

Zu 155 mg (1.00 Äquiv.) 2-Chlortritylchlorid-Harz (Startbeladung 1,55 mmol/g) in einer 5 mL-Spritze mit Frittenboden (MultiSynTech, Witten, Deutschland) wurden 77 mg (0,24 mmol, 1 Äquiv.) Fmoc-Ala-OH × H₂O und 167 µL (0,96 mmol, 4.00 Äquiv.) DIPEA, angelöst in 2 mL trockenem DCM, gegeben. Die Spritze wurde 2 h bei RT geschüttelt und anschließend 3 × 1 min mit einer Mischung aus DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1), 3 × 1 min mit DCM und 3 × 1 min mit DMF gewaschen.

Nach der Harzbeladung wurden die Aminosäuren Fmoc-Gln(Trt)-OH und Fmoc-Arg(Pbf)-OH nach dem in Tabelle 38 gezeigten Schema gekuppelt.

Tabelle 38: Durchführung der SPPS.

Schritt	Aktion	Reagenzien	Wdh.
1	Waschen 1 min	DMF	2
2	Fmoc-Abspaltung 5 min	20 % Piperidin in DMF	1
3	Fmoc-Abspaltung 20 min	20 % Piperidin in DMF	1
4	Waschen 1 min	DMF	1
5	Kupplung mit 4 Äquiv. Fmoc-AS und 8 Äquiv. DIPEA, 2 h		
6	Waschen 1 min	DMF	6

Nach Kupplung der letzten Aminosäure und anschließender Fmoc-Abspaltung wurde das Harz mit 210 mg (0,96 mmol, 4.00 Äquiv.) Boc_2O und 168 μL (0,96 mmol, 4.00 Äquiv.) DIPEA, gelöst in 1,5 mL DMF, versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das geschützte Peptid 3 \times 30 min mit 1 % TFA vom Harz abgespalten und die vereinigten Abspaltlösungen i.V. eingeeengt. Das erhaltene Öl wurde in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 53 mg (0,24 mmol, 1.00 Äquiv. basierend auf der Ausgangsbeladung des Harzes) H-Ala-Amba \times 2 HCl, 106 mg BOP (0,24 mmol, 1.00 Äquiv.) und 84 μL (0,48 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 3 h (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt und das LM i.V. eingeeengt.

Der Rückstand wurde mit 10 mL TFA/TIS/ H_2O (95/2,5/2,5 v/v/v) versetzt und 3 h bei RT gerührt. Nach nahezu vollständigem Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) wurde die Lösung in 40 mL Ether getropft. Das ausgefallene Rohprodukt wurde durch Zentrifugation (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) isoliert, der Rückstand in Diethylether resuspendiert und der Ansatz erneut zentrifugiert. Der erhaltene Feststoff wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das Lösemittel i. V. teilweise eingeeengt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 41 mg (0,05 mmol; 20,8 % der Theorie), weißes Lyophilisat, HPLC 13,1 min (Start bei 1 % LM B).

MS gefunden m/z: 505,27 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

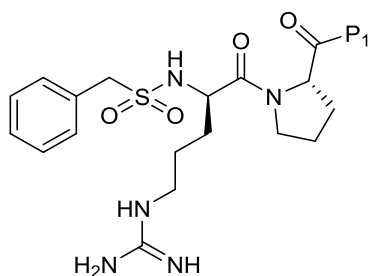
5.4.2 Synthese der Inhibitoren des Kallikrein 7

5.4.2.1 Synthese der Inhibitoren des Typs Bzls-D-Arg-Pro-P1

1.00 Äquiv. Bzls-D-Arg-Pro-OH \times HCl (**139**) (ca. 0,1 mmol) und 1.00 Äquiv. des jeweiligen P1-Bausteines wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 1.00 Äquiv. BOP und 2 Äquiv. DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und weitere 3 h bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt. Das LM wurde i.V. eingengt, der Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das LM i.V. teilweise eingengt und das Produkt lyophilisiert.

Die analytischen Daten der Inhibitoren sind in Tabelle 39 gezeigt.

Tabelle 39: Analytische Daten der Inhibitoren folgender allgemeiner Struktur, die durch Kupplung von BzIs-d-Arg-Pro-OH (**139**) an kommerziell erhältliche oder synthetisierte P1-Reste erhalten wurden.



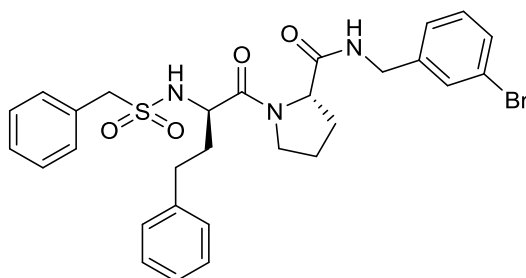
Nr.	P1 ^a	MS ber.	MS gefunden	HPLC min ^b
140		582,16 (M)	583,15 (M+H) ⁺	35,8
141		544,25 (M)	545,21 (M+H) ⁺	29,5
142		532,23 (M)	533,20 (M+H) ⁺	30,3
143	 (223)	578,2 (M)	579,12 (M+H) ⁺	32,4
144		514,24 (M)	515,18 (M+H) ⁺	39,6
145		528,25 (M)	529,15 (M+H) ⁺	31,6
146	 (222)	557,24 (M)	558,17 (M+H) ⁺	19,8
147	 (224)	564,19 (M)	565,12 (M+H) ⁺	26,6
148		554,15 (M)	555,07 (M+H) ⁺	33,3
149		529,66 (M)	530,51 (M+H) ⁺	15,0

^aDie verwendeten P1-Bausteine waren im Arbeitskreis vorhanden oder wurden kommerziell erworben. Die Verwendung eigener Synthesen ist als Fußnote beim jeweiligen P1-Rest vermerkt

^bStart HPLC bei 10 % LM B

5.4.2.2 Synthese der Inhibitoren des Typs Bzls-D-hPhe-Pro-P1

Bzls-D-hPhe-Pro-Amb(3-Br) (279)



279

Exact Mass: 597,13

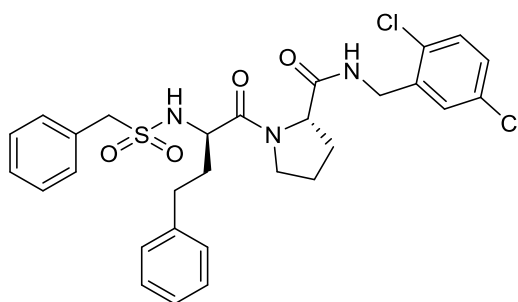
Molecular Weight: 598,56

50 mg (0,15 mmol, 1.00 Äquiv.) Bzls-D-hPhe- OH (**151**) wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 60 mg (0,15 mmol, 1.00 Äquiv.) H-Pro-3-Brombenzylamin × TFA (**227**), 66 mg (0,15 mmol, 1.00 Äquiv.) BOP und 78 µL (0,45mmol, 3.00 Äquiv.) DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und weitere 3 h bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt und i.V. eingengt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das Lösungsmittel i.V. eingengt und lyophilisiert.

Ausbeute: 6 mg (0,01 mmol; 6,7 % der Theorie), braunes Lyophilisat, HPLC 25,6 min (Start bei 40 % LM B).

MS gefunden m/z: 598,15 (M+H)⁺.

Bzls-D-hPhe-Pro-Amb(2,5-Cl₂) (280)



280

Exact Mass: 587,14

Molecular Weight: 588,54

Die Synthese der Zielverbindung **280** erfolgte analog der Vorschrift für die Verbindung **279** aus 50 mg (0,15 mmol) Bzls-D-hPhe-OH (**151**) und 58 mg (0,15 mmol, 1.00 Äquiv.) H-Pro-(2,5-Dichlor)benzylamin × TFA (**228**) in 5 mL DMF.

Ausbeute: 26 mg (0,04 mmol; 26,7 % der Theorie), braunes Lyophilisat, HPLC 29,8 min (Start bei 40 % LM B).

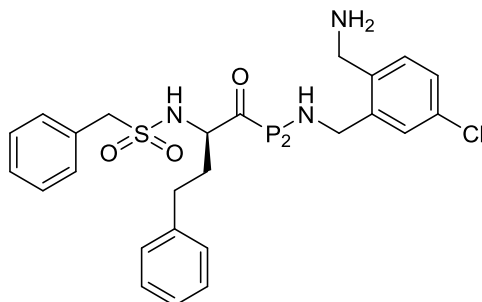
MS gefunden m/z : 588,05 ($M+H$)⁺.

5.4.2.3 Synthese der Inhibitoren des Typs Bzls-D-hPhe-P2-AMCB

1.00 Äquiv. Bzls-D-hPhe-OH (**151**) (ca. 0,15 mmol) und 1.00 Äquiv. des jeweiligen P2-ABMCB-Bausteines wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 1.00 Äquiv. BOP und 2.00 Äquiv. DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und weitere 3 h bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt und das LM i.V. eingengt. Der Rückstand wurde mit 5 mL TFA versetzt, für 1 h bei RT gerührt und die Lösung in 40 mL Ether eingetropt. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Zentrifugation (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) isoliert, nochmal in ca. 40 mL Ether resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Feststoff wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das LM i.V. teilweise eingengt und das Produkt lyophilisiert.

Die analytischen Daten der Inhibitoren sind in Tabelle 40 gezeigt.

Tabelle 40: Analytische Daten der Inhibitoren folgender Struktur, die durch Kupplung von Bzls-D-hPhe-OH an die in der Tabelle angegebenen P2-P1-Segemente und nachfolgende Entschützung erhalten wurden.



Nr.	P2	P2-P1-Baustein	MS ber.	MS gefunden	HPLC min ^a
160		232	572,19 (M)	573,13 (M+H) ⁺	22,1
161		248	597,22 (M)	598,21 (M+H) ⁺	17,9
162		247	597,22 (M)	598,17 (M+H) ⁺	17,3
163		233	596,22 (M)	597,12 (M+H) ⁺	31,3
164		230	556,19 (M)	557,16 (M+H) ⁺	23,7
165		229	598,24 (M)	599,18 (M+H) ⁺	31,3
166		231	542,18 (M)	543,18 (M+H) ⁺	22,7

^aStart HPLC bei 10 % LM B

161: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 1,1 ppm (s, 3H) 1,9 ppm (m, 2H), 3,7 ppm (d, J = 4,00 Hz, 2H), 4,0 ppm (m, 2H), 4,4 ppm (s 2H), 7,3 ppm (m, 13H), 8,1 ppm (m, 6H), 9,1 (S, 1H).

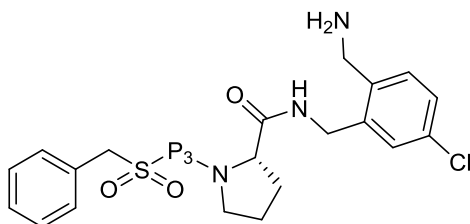
5.4.2.4 Synthese der Inhibitoren des Typs Bzls-P3-Pro-AMCB

1.00 Äquiv. H-Pro-ABMCB × Acetat (**152**) (ca. 0,1 mmol) und 1.00 Äquiv. des jeweiligen Bzls-P3-OH-Bausteines wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 1.00 Äquiv. BOP und 2.00 Äquiv. DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und weitere 3 h bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt und das LM i.v. eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 5 mL TFA versetzt, für 1 h bei RT gerührt und die Lösung in 40 mL Ether eingetropft. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Zentrifugation (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) isoliert, nochmal in ca. 40 mL Ether resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Feststoff wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das LM i.V. teilweise eingeeengt und das Produkt lyophilisiert.

Zur Synthese der Inhibitoren **156** und **157** sowie **155** und **159** wurden die racemischen Bzls-P3-OH Bausteine Bzls-D/L-hPhe(4-Cl) (**235**) bzw. Bzls-D/L-hPhe(3-Cl) (**236**) eingesetzt. Die nach Umsetzung mit H-Pro-ABMCB (**152**) und Schutzgruppenabspaltung erhaltenen Diastereomerenpaare konnten mittels präparativer HPLC getrennt werden.

Die analytischen Daten der dargestellten Inhibitoren sind in Tabelle 41 gezeigt.

Tabelle 41: Analytische Daten der Inhibitoren mit folgender Struktur, die durch Kupplung der in der Tabelle angegebenen P4-P3-Bausteine an H-Pro-ABMCB und nachfolgende Entschützung hergestellt wurden.



Nr.	P3	P4-P3-Baustein ^b	MS ber.	MS gefunden	HPLC min ^a
153		151	582,21 (M)	583,31 (M+H) ⁺	28,8
154		193	598,20 (M)	599,22 (M+H) ⁺	21,7
155		236	616,17 (M)	617,06 (M+H) ⁺	31,3
156		235	616,17 (M)	617,06 (M+H) ⁺	30,2
157		235	616,17 (M)	617,10 (M+H) ⁺	31,0
158			508,15 (M)	509,10 (M+H) ⁺	14,4
159		236	616,17 (M)	617,06 (M+H) ⁺	30,2

^aStart HPLC bei 10 % LM B

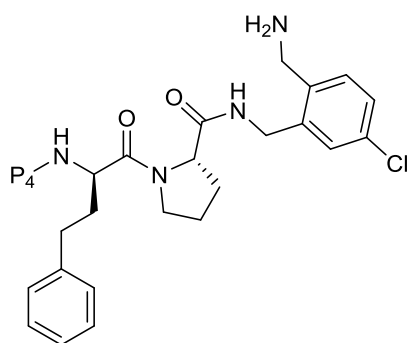
^bfür die Synthese von **158** wurde innerhalb der Arbeitsgruppe vorliegendes Bzls-D-Ser(tBu)-OH eingesetzt

5.4.2.5 Synthese der Inhibitoren des Typs P4-D-hPhe-Pro-AMCB

1.00 Äquiv. H-Pro-ABMCB × Acetat (**152**) (ca. 0,1 mmol) und 1.00 Äquiv. des jeweiligen P4-D-hPhe-Bausteines wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 1.00 Äquiv. BOP und 2.00 Äquiv. DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und weitere 3 h bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt und das LM i.V. eingengt. Der Rückstand wurde mit 5 mL TFA versetzt, für 1 h bei RT gerührt und die Lösung in 40 mL Ether eingetropft. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Zentrifugation (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) isoliert, nochmal in ca. 40 mL Ether resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Feststoff wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das LM i.V. teilweise eingengt und das Produkt lyophilisiert.

Die analytischen Daten der dargestellten Inhibitoren sind in Tabelle 42 gezeigt.

Tabelle 42: Analytische Daten der Inhibitoren folgender Struktur.

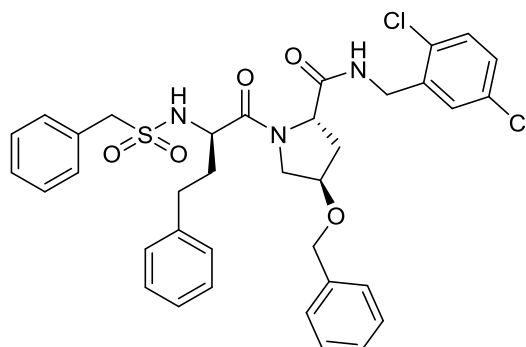


Nr.	P4	P4-P3-Baustein	MS ber.	MS gefunden	HPLC min ^a
167		238	607,20 (M)	608,04 (M+H) ⁺	26,2
168		226	589,25 (M)	590,10 (M+H) ⁺	28,8
169		244	596,22 (M)	597,39 (M+H) ⁺	31,8
170		237	616,17 (M)	617,01 (M+H) ⁺	31,2
171		115	548,22 (M)	549,21 (M+H) ⁺	25,4
172		252	520,19 (M)	521,21 (M+H) ⁺	19,8
173		267	627,19 (M)	628,21 (M+H) ⁺	26,3
174		242	596,22 (M)	569,98 (M+H) ⁺	29,5
175		234	506,26 (M)	507,13 (M+H) ⁺	21,5
176		241	650,13 (M)	653,10 (M+H) ⁺	21,7
177		239	568,19 (M)	569,08 (M+H) ⁺	25,8
178		243	594,21 (M)	595,16 (M+H) ⁺	29,5

^aStart HPLC bei 10 % LM B

5.4.2.6 Synthese der Inhibitoren mit substituierten Prolin-Derivaten in P2-Position

Bzls-D-hPhe-Pro-Amb(3-Br) (281)



281

Exact Mass: 693,18
Molecular Weight: 694,67

107 mg (0,20 mmol) Bzls-D-hPhe-4R-Hyp(Bzl)-OH (**246**) und 35 mg (0,20 mmol, 1.00 Äquiv.) 2,5-Dichlorbenzylamin wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 88 mg BOP (0,20 mmol, 1.00 Äquiv) und 70 μ L (0,40 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und ca. 3 h bei RT gerührt, das LM wurde i.V. eingengt, der Rückstand mit 5 mL TFA versetzt und für 1 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde in 40 mL Ether eingetropf. Nach Zentrifugation (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) des ausgefallenen Produktes wurde der Überstand abgegossen, der Feststoff in 40 mL Ether resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der erhaltene Feststoff wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das LM i.V. eingengt, der Rückstand in 80 % *tert*-BuOH gelöst und das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 5 mg ($7,2 \times 10^{-3}$ mmol; 3,6 % der Theorie), braunes Lyophilisat, HPLC 26,4 min (Start bei 50 % LM B).

MS gefunden m/z: 694,18 (M+H)⁺.

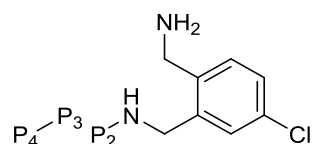
Weitere substituierte Prolin-Derivate

1.00 Äquiv. ABMCB (ca. 0,1 mmol) und 1.00 Äquiv. des jeweiligen P4-P3-P2-Bausteins wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 1.00 Äquiv. BOP und 2.00 Äquiv. DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und weitere 3 h bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt und das LM i.V. eingengt. Der Rückstand wurde mit 5 mL TFA versetzt, für 1 h bei RT gerührt und die Lösung in 40 mL Ether eingetropf. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Zentrifugation (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) isoliert, nochmal in ca. 40 mL Ether resuspendiert und erneut zentrifugiert.

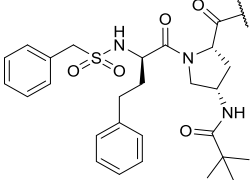
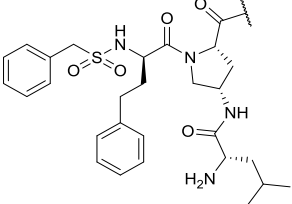
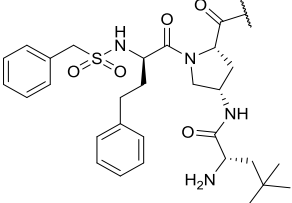
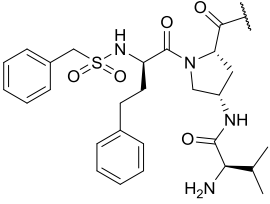
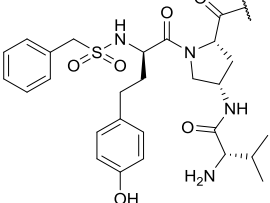
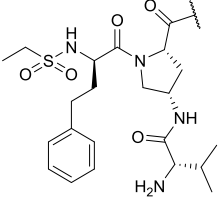
Der Feststoff wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das LM i.V. teilweise eingengt und das Produkt lyophilisiert.

Die analytischen Daten der dargestellten Inhibitoren sind in Tabelle 43 gezeigt.

Tabelle 43: Analytische Daten der Inhibitoren mit folgender Struktur, die durch Kupplung der in der Tabelle angegebenen P4-P3-P2-Bausteine an ABMCB und nachfolgende Entschützung hergestellt wurden.



Nr.	P4-P3-P2	P4-P3-P2-Baustein	MS ber.	MS gefunden	HPLC min ^a
184		183	696,29 (M)	697,36 (M+H) ⁺	20,5
185		259	710,30 (M)	711,38 (M+H) ⁺	21,9
186		262	696,29 (M)	697,50 (M+H) ⁺	20,7
187		257	668,25 (M)	699,28 (M+H) ⁺	18,7
188		261	710,30 (M)	711,34 (M+H) ⁺	22,1

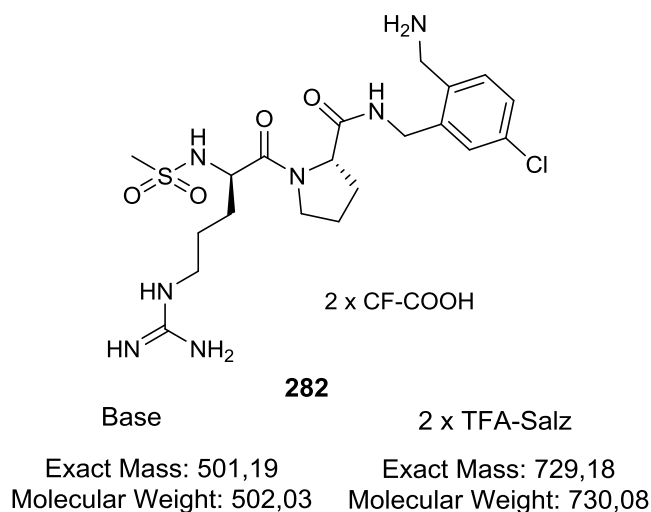
189		264	681,28 (M)	682,39 (M+H) ⁺	30,5
190		258	710,30 (M)	711,43 (M+H) ⁺	22,4
191		260	724,32 (M)	725,35 (M+H) ⁺	23,9
192		263	696,29 (M)	349,20 (M/2+H) ⁺	18,9
198		197	712,28 (M)	713,29 (M+H) ⁺	15,8
199		265	634,27 (M)	635,27 (M+H) ⁺	15,1

^aStart HPLC bei 20 % LM B

184: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 0,9 ppm (d, J = 4,00 Hz, 6H), 1,7 ppm (m, 1H), 1,9 ppm (m, 1H), 2,1 ppm (m, 1H), 3,4 ppm (d, J = 8,00 Hz, 1H), 3,7 ppm (m, 1H), 4,5 ppm (m, 9H), 7,3 ppm (m, 13H), 8,0 ppm (m, 6H), 8,7 ppm (m, 2H).

5.4.2.7 Synthèse des Inhibiteurs Mes-d-Arg-Pro-AMCB

Mes-D-Arg-Pro-AMCB x TFA (282)



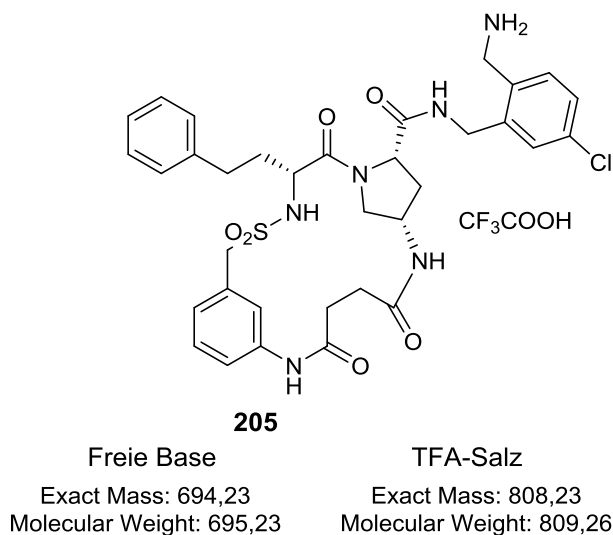
47 mg (0,11 mmol) ABMCB wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 56 mg (0,11 mmol, 1.00 Äquiv.) Mes-DArg(Pbf)-OH (**120**), 49 mg BOP (0,11 mmol, 1.00 Äquiv) und 38 µL (0,22 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und weitere 3 h bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt und i.V. eingengt. Der Rückstand wurde mit 5 mL TFA versetzt, für 1 h bei RT gerührt und die Lösung in 40 mL Ether eingetroppt. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Zentrifugation (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) isoliert, nochmal in ca. 40 mL Ether resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Feststoff wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das LM i.V. teilweise eingengt und das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 25 mg (0,04 mmol; 36,4 % der Theorie), weißes Lyophilisat, HPLC 13,8 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 502,07 (M+H)⁺.

5.4.2.8 Synthese eines zyklischen Inhibitors

3-NH-BzIs-D-hPhe-Pro(4S-NH-CO-(CH₂)₂-CO)-AMCB × TFA (205)



19 mg (0,07 mmol) ABMCB wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 38 mg (0,07 mmol, 1.00 Äquiv.) c[3-NH-BzIs-D-hPhe-Pro(4S-NH-CO-(CH₂)₂-CO)]-OH (**204**), 31 mg BOP (0,07 mmol, 1.00 Äquiv) und 24 µL (0,14 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und weitere 3 h bis zum fast vollständigen Umsatz (Reaktionskontrolle mittels HPLC) bei RT gerührt und i.V. eingengt. Der Rückstand wurde mit 5 mL TFA versetzt, für 1 h bei RT gerührt und die Lösung in 40 mL Ether eingetroppt. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Zentrifugation (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) isoliert, nochmal in ca. 40 mL Ether resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Feststoff wurde mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das LM i.V. teilweise eingengt und das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: 8 mg (0,01 mmol; 14,3 % der Theorie), weißes Lyophilisat, HPLC 20,4 min (Start bei 20 % LM B).

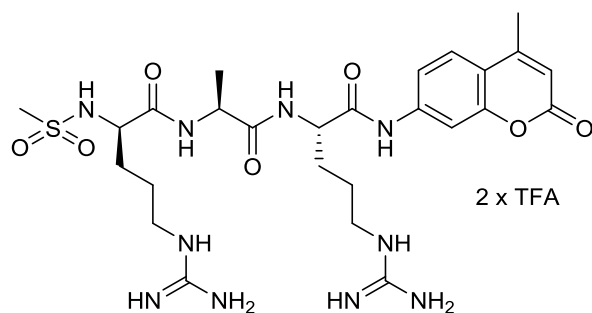
MS gefunden m/z: 694,49 (M+H)⁺.

5.5 Synthese der Substrate

5.5.1 Synthese der Matriptase-Substrate

5.5.1.1 Mes-D-Arg-Ala-Arg-AMC

Mes-D-Arg-Ala-Arg-AMC × 2 TFA (**74**)



74

freie Base

2 x TFA-Salz

Exact Mass: 636,28

Exact Mass: 864,27

Molecular Weight: 636,73 Molecular Weight: 864,78

38 mg (0,08 mmol, 1.00 Äquiv.) Mes-D-Arg(Pbf)-OH (**120**) wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 50 mg (0,08 mmol, 1.00 Äquiv.) H-Ala-Arg-AMC × 2 TFA (**271**), 35 mg (0,08 mmol, 1.00 Äquiv.) BOP und 56 µL (0,32 mmol, 4.00 Äquiv.) DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und 5 h bei RT gerührt (Reaktionskontrolle mittels HPLC) und i.V. eingengt. Der ölige Rückstand wurde mit 5 mL TFA versetzt und für 1 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde in 40 mL Ether (im 50 mL Falcon) eingetropft und der ausgefallene Feststoff durch Zentrifugation (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) isoliert. Der Feststoff wurde in 40 mL Ether resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde der Feststoff mittels präparativer HPLC gereinigt, die produkthaltigen Fraktionen vereinigt, das Lösemittel i. V. teilweise eingengt und das Produkt aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 18 mg (0,02 mmol; 25,0 % der Theorie), weißes Lyophilisat, HPLC 16,4 min (Start bei 10 % LM B).

MS gefunden m/z: 637,24 (M+H)⁺.

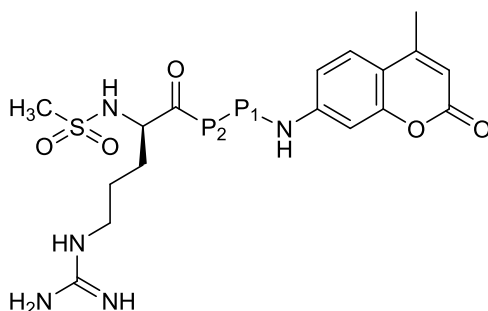
5.5.2 Synthese der KLK 7-Substrate

5.5.2.1 Substrate des Typs Mes-D-Arg-P2-P1-AMC

1.00 Äquiv. (ca. 0,1 mmol) Mes-D-Arg(Pbf)-OH (**120**) und 1.00 Äquiv. des jeweiligen P2-P1-AMC-Bausteines wurden in 10 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 1.00 Äquiv. BOP und 2.00 Äquiv. DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und ca. 5h bei RT gerührt und das LM i.V. entfernt. Der Rückstand wurde mit 5 mL TFA versetzt, für 4 h bei RT gerührt und mit 40 mL Ether gefällt. Nach Zentrifugation (ca. 5 min, 4 °C, 5000 rpm) wurde der Überstand abgegossen, der Feststoff in 40 mL Ether resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Feststoff mittels präparativer HPLC gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt, das LM i.V. teilweise eingengt und das Produkt lyophilisiert.

Die analytischen Daten der dargestellten Substrate sind in Tabelle 44 gezeigt.

Tabelle 44: Analytische Daten der dargestellten Substrate.



Nr.	P2-P1	P2-P1-AMC-Baustein	MS ber.	MS gefunden	HPLC min ^a
119		121	669,26 (M)	670,19 (M+H) ⁺	15,5
123		275	653,26 (M)	654,22 (M+H) ⁺	20,3
124		277	685,29 (M)	686,17 (M+H) ⁺	18,7
127		278	685,29 (M)	686,26 (M+H) ⁺	18,8

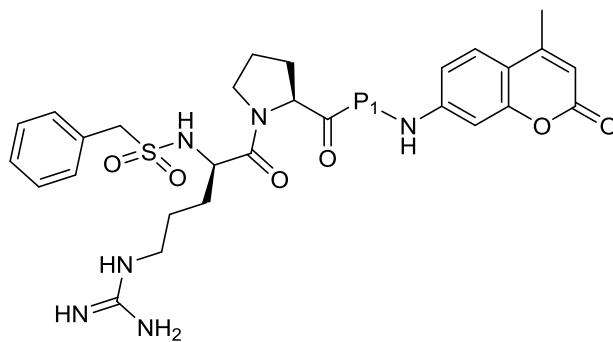
^aStart HPLC bei 10 % LM B

5.5.2.2 Substrate des Typs Bzls-D-Arg-Pro-P1-AMC

1.00 Äquiv. (ca. 0,1 mmol) Bzls-D-Arg-Pro-OH \times HCl (**131**) und 1.00 Äquiv. des jeweiligen P1-AMC-Bausteines wurden in 10 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 1.00 Äquiv. BOP und 2.00 Äquiv. DIPEA versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und ca. 5 h bei RT gerührt und das LM i.V. entfernt. Der Rückstand wurde mit 5 mL TFA versetzt, für 4 h bei RT gerührt und mit 40 mL Ether gefällt. Nach Zentrifugation (ca. 5 min, 4°C, 5000 rpm) wurde der Überstand abgegossen, der Feststoff in 40 mL Ether resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Feststoff mittels präparativer HPLC gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt, das LM i.V. teilweise eingengt und das Produkt lyophilisiert.

Die analytischen Daten der dargestellten Substrate sind in Tabelle 45 gezeigt.

Tabelle 45: Analytische Daten der dargestellten Substrate.



Nr.	P1	P1-AMC-Baustein	MS ber.	MS gefunden	HPLC min ^a
125		277	745,29 (M)	746,20 (M+H) ⁺	22,6
126		275	729,26 (M)	730,22 (M+H) ⁺	27,8

^aStart HPLC bei 10 % LM B

6 Literaturverzeichnis

1. Cal, S.; Quesada, V.; Garabaya, C.; Lopez-Otin, C., Polyserase-I, a human polyprotease with the ability to generate independent serine protease domains from a single translation product. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**, *100* (16), 9185-90.
2. Antalis, T. M.; Bugge, T. H.; Wu, Q., Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* **2011**, *99*, 1-50.
3. Shi, Y. E.; Torri, J.; Yieh, L.; Wellstein, A.; Lippman, M. E.; Dickson, R. B., Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells. *Cancer Res* **1993**, *53* (6), 1409-15.
4. Takeuchi, T.; Shuman, M. A.; Craik, C. S., Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, *96* (20), 11054-61.
5. Tanimoto, H.; Underwood, L. J.; Wang, Y.; Shigemasa, K.; Parmley, T. H.; O'Brien, T. J., Ovarian tumor cells express a transmembrane serine protease: a potential candidate for early diagnosis and therapeutic intervention. *Tumour Biol* **2001**, *22* (2), 104-14.
6. List, K.; Szabo, R.; Molinolo, A.; Nielsen, B. S.; Bugge, T. H., Delineation of matriptase protein expression by enzymatic gene trapping suggests diverging roles in barrier function, hair formation, and squamous cell carcinogenesis. *Am J Pathol* **2006**, *168* (5), 1513-25.
7. List, K.; Bugge, T. H.; Szabo, R., Matriptase: potent proteolysis on the cell surface. *Mol Med* **2006**, *12* (1-3), 1-7.
8. Kojima, K.; Inouye, K., Activation of matriptase zymogen. *J Biochem* **2011**, *150* (2), 123-5.
9. Oberst, M. D.; Williams, C. A.; Dickson, R. B.; Johnson, M. D.; Lin, C. Y., The activation of matriptase requires its noncatalytic domains, serine protease domain, and its cognate inhibitor. *J Biol Chem* **2003**, *278* (29), 26773-9.
10. Lin, C. Y.; Anders, J.; Johnson, M.; Dickson, R. B., Purification and characterization of a complex containing matriptase and a Kunitz-type serine protease inhibitor from human milk. *J Biol Chem* **1999**, *274* (26), 18237-42.
11. Colombo, E.; Desilets, A.; Duchene, D.; Chagnon, F.; Najmanovich, R.; Leduc, R.; Marsault, E., Design and synthesis of potent, selective inhibitors of matriptase. *ACS Med Chem Lett* **2012**, *3* (7), 530-4.
12. Friedrich, R.; Fuentes-Prior, P.; Ong, E.; Coombs, G.; Hunter, M.; Oehler, R.; Pierson, D.; Gonzalez, R.; Huber, R.; Bode, W.; Madison, E. L., Catalytic domain structures of MT-SP1/matriptase, a matrix-degrading transmembrane serine proteinase. *J Biol Chem* **2002**, *277* (3), 2160-8.
13. Steinmetzer, T.; Schweinitz, A.; Stürzebecher, A.; Dönnecke, D.; Uhland, K.; Schuster, O.; Steinmetzer, P.; Müller, F.; Friedrich, R.; Than, M. E.; Bode, W.; Stürzebecher, J., Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase. *J Med Chem* **2006**, *49* (14), 4116-26.

14. Yuan, C.; Chen, L.; Meehan, E. J.; Daly, N.; Craik, D. J.; Huang, M.; Ngo, J. C., Structure of catalytic domain of Matriptase in complex with Sunflower trypsin inhibitor-1. *BMC Struct Biol* **2011**, *11*, 30.
15. Goswami, R.; Wohlfahrt, G.; Mukherjee, S.; Ghadiyaram, C.; Nagaraj, J.; Satyam, L. K.; Subbarao, K.; Gopinath, S.; Krishnamurthy, N. R.; Subramanya, H. S.; Ramachandra, M., Discovery of O-(3-carbamimidoylphenyl)-l-serine amides as matriptase inhibitors using a fragment-linking approach. *Bioorg Med Chem Lett* **2015**, *25* (3), 616-20.
16. Katz, B. A.; Sprengeler, P. A.; Luong, C.; Verner, E.; Elrod, K.; Kirtley, M.; Janc, J.; Spencer, J. R.; Breitenbucher, J. G.; Hui, H.; McGee, D.; Allen, D.; Martelli, A.; Mackman, R. L., Engineering inhibitors highly selective for the S1 sites of Ser190 trypsin-like serine protease drug targets. *Chem Biol* **2001**, *8* (11), 1107-21.
17. Takeuchi, T.; Harris, J. L.; Huang, W.; Yan, K. W.; Coughlin, S. R.; Craik, C. S., Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem* **2000**, *275* (34), 26333-42.
18. Beliveau, F.; Desilets, A.; Leduc, R., Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides. *FEBS J* **2009**, *276* (8), 2213-26.
19. Lee, S. L.; Dickson, R. B.; Lin, C. Y., Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem* **2000**, *275* (47), 36720-5.
20. Seitz, I.; Hess, S.; Schulz, H.; Eckl, R.; Busch, G.; Montens, H. P.; Brandl, R.; Seidl, S.; Schomig, A.; Ott, I., Membrane-type serine protease-1/matriptase induces interleukin-6 and -8 in endothelial cells by activation of protease-activated receptor-2: potential implications in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2007**, *27* (4), 769-75.
21. Jin, X.; Yagi, M.; Akiyama, N.; Hirosaki, T.; Higashi, S.; Lin, C. Y.; Dickson, R. B.; Kitamura, H.; Miyazaki, K., Matriptase activates stromelysin (MMP-3) and promotes tumor growth and angiogenesis. *Cancer Sci* **2006**, *97* (12), 1327-34.
22. Duffy, M. J.; Duggan, C., The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem* **2004**, *37* (7), 541-8.
23. Schweinitz, A.; Steinmetzer, T.; Banke, I. J.; Arlt, M. J.; Stürzebecher, A.; Schuster, O.; Geissler, A.; Giersiefen, H.; Zeslawska, E.; Jacob, U.; Krüger, A.; Stürzebecher, J., Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J Biol Chem* **2004**, *279* (32), 33613-22.
24. Uhland, K., Matriptase and its putative role in cancer. *Cell Mol Life Sci* **2006**, *63* (24), 2968-78.
25. Trusolino, L.; Comoglio, P. M., Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2* (4), 289-300.
26. Comoglio, P. M.; Trusolino, L., Invasive growth: from development to metastasis. *J Clin Invest* **2002**, *109* (7), 857-62.

27. Davies, G.; Mason, M. D.; Martin, T. A.; Parr, C.; Watkins, G.; Lane, J.; Matsumoto, K.; Nakamura, T.; Jiang, W. G., The HGF/SF antagonist NK4 reverses fibroblast- and HGF-induced prostate tumor growth and angiogenesis in vivo. *Int J Cancer* **2003**, *106* (3), 348-54.
28. Matsumoto, K.; Nakamura, T., NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. *Cancer Sci* **2003**, *94* (4), 321-7.
29. Cao, B.; Su, Y.; Oskarsson, M.; Zhao, P.; Kort, E. J.; Fisher, R. J.; Wang, L. M.; Vande Woude, G. F., Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, *98* (13), 7443-8.
30. O'Brien, P. J.; Molino, M.; Kahn, M.; Brass, L. F., Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene* **2001**, *20* (13), 1570-81.
31. Shi, X.; Gangadharan, B.; Brass, L. F.; Ruf, W.; Mueller, B. M., Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res* **2004**, *2* (7), 395-402.
32. List, K.; Hobson, J. P.; Molinolo, A.; Bugge, T. H., Co-localization of the channel activating protease prostatic/PRSS8 with its candidate activator, matriptase. *J Cell Physiol* **2007**, *213* (1), 237-45.
33. Netzel-Arnett, S.; Currie, B. M.; Szabo, R.; Lin, C. Y.; Chen, L. M.; Chai, K. X.; Antalis, T. M.; Bugge, T. H.; List, K., Evidence for a matriptase-prostatic proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation. *J Biol Chem* **2006**, *281* (44), 32941-5.
34. Sales, K. U.; Masedunskas, A.; Bey, A. L.; Rasmussen, A. L.; Weigert, R.; List, K.; Szabo, R.; Overbeek, P. A.; Bugge, T. H., Matriptase initiates activation of epidermal pro-kallikrein and disease onset in a mouse model of Netherton syndrome. *Nat Genet* **2010**, *42* (8), 676-83.
35. Lin, C. Y.; Wang, J. K.; Torri, J.; Dou, L.; Sang, Q. A.; Dickson, R. B., Characterization of a novel, membrane-bound, 80-kDa matrix-degrading protease from human breast cancer cells. Monoclonal antibody production, isolation, and localization. *J Biol Chem* **1997**, *272* (14), 9147-52.
36. Riddick, A. C.; Shukla, C. J.; Pennington, C. J.; Bass, R.; Nuttall, R. K.; Hogan, A.; Sethia, K. K.; Ellis, V.; Collins, A. T.; Maitland, N. J.; Ball, R. Y.; Edwards, D. R., Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. *Br J Cancer* **2005**, *92* (12), 2171-80.
37. Jin, J. S.; Hsieh, D. S.; Loh, S. H.; Chen, A.; Yao, C. W.; Yen, C. Y., Increasing expression of serine protease matriptase in ovarian tumors: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters. *Mod Pathol* **2006**, *19* (3), 447-52.
38. Santin, A. D.; Cane, S.; Bellone, S.; Bignotti, E.; Palmieri, M.; De Las Casas, L. E.; Anfossi, S.; Roman, J. J.; O'Brien, T.; Pecorelli, S., The novel serine protease tumor-associated differentially expressed gene-15 (matriptase/MT-SP1) is highly overexpressed in cervical carcinoma. *Cancer* **2003**, *98* (9), 1898-904.
39. Cheng, M. F.; Tzao, C.; Tsai, W. C.; Lee, W. H.; Chen, A.; Chiang, H.; Sheu, L. F.; Jin, J. S., Expression of EMMPRIN and matriptase in esophageal squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathological parameters. *Dis Esophagus* **2006**, *19* (6), 482-6.

40. Santin, A. D.; Zhan, F.; Bellone, S.; Palmieri, M.; Cane, S.; Bignotti, E.; Anfossi, S.; Gokden, M.; Dunn, D.; Roman, J. J.; O'Brien, T. J.; Tian, E.; Cannon, M. J.; Shaughnessy, J., Jr.; Pecorelli, S., Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int J Cancer* **2004**, *112* (1), 14-25.
41. Zeng, L.; Cao, J.; Zhang, X., Expression of serine protease SPC19/matriptase and its inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in normal and malignant tissues of gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* **2005**, *11* (39), 6202-7.
42. Oberst, M. D.; Johnson, M. D.; Dickson, R. B.; Lin, C. Y.; Singh, B.; Stewart, M.; Williams, A.; al-Nafussi, A.; Smyth, J. F.; Gabra, H.; Sellar, G. C., Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. *Clin Cancer Res* **2002**, *8* (4), 1101-7.
43. Kang, J. Y.; Dolled-Filhart, M.; Ocal, I. T.; Singh, B.; Lin, C. Y.; Dickson, R. B.; Rimm, D. L.; Camp, R. L., Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer. *Cancer Res* **2003**, *63* (5), 1101-5.
44. Ihara, S.; Miyoshi, E.; Taniguchi, N., [Protease modified by sugar chain: beta 1-6 branching and matriptase]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **2003**, *48* (8 Suppl), 980-3.
45. Milner, J. M.; Patel, A.; Rowan, A. D., Emerging roles of serine proteinases in tissue turnover in arthritis. *Arthritis Rheum* **2008**, *58* (12), 3644-56.
46. Wilkinson, D. J.; Habgood, A.; Lamb, H. K.; Thompson, P.; Hawkins, A. R.; Desilets, A.; Leduc, R.; Steinmetzer, T.; Hammami, M.; Lee, M. S.; Craik, C. S.; Watson, S.; Lin, H.; Milner, J. M.; Rowan, A. D., Matriptase induces metalloproteinase-dependent aggrecanolysis in vitro and in vivo: multiple mechanisms promote cartilage damage in osteoarthritis. *Arthritis & rheumatology* **2017**.
47. Xiang, Y.; Masuko-Hongo, K.; Sekine, T.; Nakamura, H.; Yudoh, K.; Nishioka, K.; Kato, T., Expression of proteinase-activated receptors (PAR)-2 in articular chondrocytes is modulated by IL-1beta, TNF-alpha and TGF-beta. *Osteoarthritis and cartilage* **2006**, *14* (11), 1163-73.
48. Boileau, C.; Amiable, N.; Martel-Pelletier, J.; Fahmi, H.; Duval, N.; Pelletier, J. P., Activation of proteinase-activated receptor 2 in human osteoarthritic cartilage upregulates catabolic and proinflammatory pathways capable of inducing cartilage degradation: a basic science study. *Arthritis Res Ther* **2007**, *9* (6), R121.
49. Kelso, E. B.; Lockhart, J. C.; Hembrough, T.; Dunning, L.; Plevin, R.; Hollenberg, M. D.; Sommerhoff, C. P.; McLean, J. S.; Ferrell, W. R., Therapeutic promise of proteinase-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* **2006**, *316* (3), 1017-24.
50. Ascenzi, P.; Bocedi, A.; Bolognesi, M.; Spallarossa, A.; Coletta, M.; De Cristofaro, R.; Menegatti, E., The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr Protein Pept Sci* **2003**, *4* (3), 231-51.

51. Szabo, R.; Hobson, J. P.; List, K.; Molinolo, A.; Lin, C. Y.; Bugge, T. H., Potent inhibition and global co-localization implicate the transmembrane Kunitz-type serine protease inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor-2 in the regulation of epithelial matriptase activity. *J Biol Chem* **2008**, *283* (43), 29495-504.
52. Chung, C. H.; Ives, H. E.; Almeda, S.; Goldberg, A. L., Purification from *Escherichia coli* of a periplasmic protein that is a potent inhibitor of pancreatic proteases. *J Biol Chem* **1983**, *258* (18), 11032-8.
53. McGrath, M. E.; Erpel, T.; Bystroff, C.; Fletterick, R. J., Macromolecular chelation as an improved mechanism of protease inhibition: structure of the ecotin-trypsin complex. *EMBO J* **1994**, *13* (7), 1502-7.
54. Luckett, S.; Garcia, R. S.; Barker, J. J.; Konarev, A. V.; Shewry, P. R.; Clarke, A. R.; Brady, R. L., High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. *J Mol Biol* **1999**, *290* (2), 525-33.
55. Long, Y. Q.; Lee, S. L.; Lin, C. Y.; Enyedy, I. J.; Wang, S.; Li, P.; Dickson, R. B.; Roller, P. P., Synthesis and evaluation of the sunflower derived trypsin inhibitor as a potent inhibitor of the type II transmembrane serine protease, matriptase. *Bioorg Med Chem Lett* **2001**, *11* (18), 2515-9.
56. Jiang, S.; Li, P.; Lee, S. L.; Lin, C. Y.; Long, Y. Q.; Johnson, M. D.; Dickson, R. B.; Roller, P. P., Design and synthesis of redox stable analogues of sunflower trypsin inhibitors (SFTI-1) on solid support, potent inhibitors of matriptase. *Org Lett* **2007**, *9* (1), 9-12.
57. Li, P.; Jiang, S.; Lee, S. L.; Lin, C. Y.; Johnson, M. D.; Dickson, R. B.; Michejda, C. J.; Roller, P. P., Design and synthesis of novel and potent inhibitors of the type II transmembrane serine protease, matriptase, based upon the sunflower trypsin inhibitor-1. *J Med Chem* **2007**, *50* (24), 5976-83.
58. Sun, J.; Pons, J.; Craik, C. S., Potent and selective inhibition of membrane-type serine protease 1 by human single-chain antibodies. *Biochemistry* **2003**, *42* (4), 892-900.
59. Enyedy, I. J.; Lee, S. L.; Kuo, A. H.; Dickson, R. B.; Lin, C. Y.; Wang, S., Structure-based approach for the discovery of bis-benzamidines as novel inhibitors of matriptase. *J Med Chem* **2001**, *44* (9), 1349-55.
60. Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, O. D.; James, K. E., Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* **2002**, *102* (12), 4639-750.
61. Sienczyk, M.; Oleksyszyn, J., Irreversible inhibition of serine proteases - design and in vivo activity of diaryl alpha-aminophosphonate derivatives. *Curr Med Chem* **2009**, *16* (13), 1673-87.
62. Brown, C. M.; Ray, M.; Eroy-Reveles, A. A.; Egea, P.; Tajon, C.; Craik, C. S., Peptide length and leaving-group sterics influence potency of peptide phosphonate protease inhibitors. *Chem Biol* **2011**, *18* (1), 48-57.
63. Häussler, D.; Schulz-Fincke, A. C.; Beckmann, A. M.; Keils, A.; Gilberg, E.; Mangold, M.; Bajorath, J.; Stirnberg, M.; Steinmetzer, T.; Gütschow, M., A Fluorescent-Labeled Phosphono Bisbenzguanidine As an Activity-Based Probe for Matriptase. *Chemistry* **2017**.

64. Galkin, A. V.; Mullen, L.; Fox, W. D.; Brown, J.; Duncan, D.; Moreno, O.; Madison, E. L.; Agus, D. B., CVS-3983, a selective matriptase inhibitor, suppresses the growth of androgen independent prostate tumor xenografts. *Prostate* **2004**, *61* (3), 228-35.
65. Duncan, D. F.; Alfaro-Lopez, J. L.; Komandla, M.; Levy, O. E.; Moreno, O.; Semple, J. E.; Tamiz, A. P. Preparation of matriptase inhibitors for the treatment of cancer. 2004/058688. 2004.
66. Wiley, M. R.; Chirgadze, N. Y.; Clawson, D. K.; Craft, T. J.; GiffordMoore, D. S.; Jones, N. D.; Olkowski, J. L.; Weir, L. C.; Smith, G. F., D-phe-pro-p-amidinobenzylamine: A potent and highly selective thrombin inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* **1996**, *6* (20), 2387-2392.
67. Gustafsson, D.; Bylund, R.; Antonsson, T.; Nilsson, I.; Nystrom, J. E.; Eriksson, U.; Bredberg, U.; Teger-Nilsson, A. C., A new oral anticoagulant: the 50-year challenge. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3* (8), 649-59.
68. Stürzebecher, A.; Dönnecke, D.; Schweinitz, A.; Schuster, O.; Steinmetzer, P.; Stürzebecher, U.; Kotthaus, J.; Clement, B.; Stürzebecher, J.; Steinmetzer, T., Highly potent and selective substrate analogue factor Xa inhibitors containing D-homophenylalanine analogues as P3 residue: part 2. *ChemMedChem* **2007**, *2* (7), 1043-53.
69. Shiraishi, T.; Kadono, S.; Haramura, M.; Kodama, H.; Ono, Y.; Ikura, H.; Esaki, T.; Koga, T.; Hattori, K.; Watanabe, Y.; Sakamoto, A.; Yoshihashi, K.; Kitazawa, T.; Esaki, K.; Ohta, M.; Sato, H.; Kozono, T., Factor VIIa inhibitors: target hopping in the serine protease family using X-ray structure determination. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18* (16), 4533-7.
70. Stürzebecher, J.; Vieweg, H.; Steinmetzer, T.; Schweinitz, A.; Stubbs, M. T.; Renatus, M.; Wikström, P., 3-Amidinophenylalanine-based inhibitors of urokinase. *Bioorg Med Chem Lett* **1999**, *9* (21), 3147-52.
71. Setyono-Han, B.; Stürzebecher, J.; Schmalix, W. A.; Muehlenweg, B.; Sieuwerts, A. M.; Timmermans, M.; Magdolen, V.; Schmitt, M.; Klijn, J. G.; Foekens, J. A., Suppression of rat breast cancer metastasis and reduction of primary tumour growth by the small synthetic urokinase inhibitor WX-UK1. *Thromb Haemost* **2005**, *93* (4), 779-86.
72. Steinmetzer, T.; Dönnecke, D.; Korsonewski, M.; Neuwirth, C.; Steinmetzer, P.; Schulze, A.; Saupe, S. M.; Schweinitz, A., Modification of the N-terminal sulfonyl residue in 3-amidinophenylalanine-based matriptase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19* (1), 67-73.
73. Huel, N. H.; Nar, H.; Priepke, H.; Ries, U.; Stassen, J. M.; Wienen, W., Structure-based design of novel potent nonpeptide thrombin inhibitors. *J Med Chem* **2002**, *45* (9), 1757-66.
74. Ettmayer, P.; Amidon, G. L.; Clement, B.; Testa, B., Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem* **2004**, *47* (10), 2393-404.
75. Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Jarvinen, T.; Savolainen, J., Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7* (3), 255-70.
76. Hammami, M.; Rühmann, E.; Maurer, E.; Heine, A.; Gütschow, M.; Klebe, G.; Steinmetzer, T., New 3-amidinophenylalanine-derived inhibitors of matriptase. *MedChemComm* **2012**, *3* (7), 807-813.

77. Zoratti, G. L.; Tanabe, L. M.; Varela, F. A.; Murray, A. S.; Bergum, C.; Colombo, E.; Lang, J. E.; Molinolo, A. A.; Leduc, R.; Marsault, E.; Boerner, J.; List, K., Targeting matriptase in breast cancer abrogates tumour progression via impairment of stromal-epithelial growth factor signalling. *Nat Commun* **2015**, *6*, 6776.
78. Sisay, M. T.; Steinmetzer, T.; Stirnberg, M.; Maurer, E.; Hammami, M.; Bajorath, J.; Gütschow, M., Identification of the first low-molecular-weight inhibitors of matriptase-2. *J Med Chem* **2010**, *53* (15), 5523-35.
79. Sielaff, F.; Böttcher-Friebertshäuser, E.; Meyer, D.; Saupe, S. M.; Volk, I. M.; Garten, W.; Steinmetzer, T., Development of substrate analogue inhibitors for the human airway trypsin-like protease HAT. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, *21* (16), 4860-4.
80. Biela, A.; Sielaff, F.; Terwesten, F.; Heine, A.; Steinmetzer, T.; Klebe, G., Ligand binding stepwise disrupts water network in thrombin: enthalpic and entropic changes reveal classical hydrophobic effect. *J Med Chem* **2012**, *55* (13), 6094-110.
81. Böttcher-Friebertshäuser, E.; Freuer, C.; Sielaff, F.; Schmidt, S.; Eickmann, M.; Uhlenhorff, J.; Steinmetzer, T.; Klenk, H. D.; Garten, W., Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol* **2010**, *84* (11), 5605-14.
82. Schweinitz, A.; Stürzebecher, A.; Stürzebecher, U.; Schuster, O.; Stürzebecher, J.; Steinmetzer, T., New substrate analogue inhibitors of factor Xa containing 4-amidinobenzylamide as P1 residue: part 1. *Med Chem* **2006**, *2* (4), 349-61.
83. Hammami, M., Dissertation Maya Hammami "Development of new inhibitors for the type II transmembrane serine protease matriptase". **2012**.
84. Tan, X.; Soualmia, F.; Furio, L.; Renard, J. F.; Kempen, I.; Qin, L.; Pagano, M.; Pirotte, B.; El Amri, C.; Hovnanian, A.; Reboud-Ravaux, M., Toward the first class of suicide inhibitors of kallikreins involved in skin diseases. *J Med Chem* **2015**, *58* (2), 598-612.
85. Egelrud, T.; Lundstrom, A., A chymotrypsin-like proteinase that may be involved in desquamation in plantar stratum corneum. *Arch Dermatol Res* **1991**, *283* (2), 108-12.
86. Shaw, J. L.; Diamandis, E. P., Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem* **2007**, *53* (8), 1423-32.
87. Yousef, G. M.; Scorilas, A.; Magklara, A.; Soosaipillai, A.; Diamandis, E. P., The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new member of the human kallikrein gene family - genomic characterization, mapping, tissue expression and hormonal regulation. *Gene* **2000**, *254* (1-2), 119-28.
88. Ovaere, P.; Lippens, S.; Vandenabeele, P.; Declercq, W., The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem Sci* **2009**, *34* (9), 453-63.
89. Brattsand, M.; Stefansson, K.; Lundh, C.; Haasum, Y.; Egelrud, T., A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol* **2005**, *124* (1), 198-203.
90. Skytt, A.; Stromqvist, M.; Egelrud, T., Primary substrate specificity of recombinant human stratum corneum chymotryptic enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **1995**, *211* (2), 586-9.

91. Debela, M.; Magdolen, V.; Schechter, N.; Valachova, M.; Lottspeich, F.; Craik, C. S.; Choe, Y.; Bode, W.; Goettig, P., Specificity profiling of seven human tissue kallikreins reveals individual subsite preferences. *J Biol Chem* **2006**, *281* (35), 25678-88.
92. Harel, M.; Su, C. T.; Frolow, F.; Silman, I.; Sussman, J. L., Gamma-chymotrypsin is a complex of alpha-chymotrypsin with its own autolysis products. *Biochemistry* **1991**, *30* (21), 5217-25.
93. Fernandez, I. S.; Standker, L.; Magert, H. J.; Forssmann, W. G.; Gimenez-Gallego, G.; Romero, A., Crystal structure of human epidermal kallikrein 7 (hK7) synthesized directly in its native state in *E. coli*: insights into the atomic basis of its inhibition by LEKTI domain 6 (LD6). *J Mol Biol* **2008**, *377* (5), 1488-97.
94. Debela, M.; Hess, P.; Magdolen, V.; Schechter, N. M.; Steiner, T.; Huber, R.; Bode, W.; Goettig, P., Chymotryptic specificity determinants in the 1.0 Å structure of the zinc-inhibited human tissue kallikrein 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (41), 16086-91.
95. Maibaum, J.; Liao, S. M.; Vulpetti, A.; Ostermann, N.; Randl, S.; Rudisser, S.; Lorthiois, E.; Erbel, P.; Kinzel, B.; Kolb, F. A.; Barbieri, S.; Wagner, J.; Durand, C.; Fettis, K.; Dussauge, S.; Hughes, N.; Delgado, O.; Hommel, U.; Gould, T.; Mac Sweeney, A.; Gerhartz, B.; Cumin, F.; Flohr, S.; Schubart, A.; Jaffee, B.; Harrison, R.; Risitano, A. M.; Eder, J.; Anderson, K., Small-molecule factor D inhibitors targeting the alternative complement pathway. *Nat Chem Biol* **2016**, *12* (12), 1105-1110.
96. Bode, W.; Schwager, P.; Huber, R., The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* **1978**, *118* (1), 99-112.
97. Bode, W.; Chen, Z.; Bartels, K.; Kutzbach, C.; Schmidt-Kastner, G.; Bartunik, H., Refined 2 Å X-ray crystal structure of porcine pancreatic kallikrein A, a specific trypsin-like serine proteinase. Crystallization, structure determination, crystallographic refinement, structure and its comparison with bovine trypsin. *J Mol Biol* **1983**, *164* (2), 237-82.
98. Bode, W., Schwager, P., The single calcium-binding site of crystalline bovine β -trypsin. *FEBS Lett* **1975**, *56* (1), 139-43.
99. Debela, M.; Magdolen, V.; Grimminger, V.; Sommerhoff, C.; Messerschmidt, A.; Huber, R.; Friedrich, R.; Bode, W.; Goettig, P., Crystal structures of human tissue kallikrein 4: activity modulation by a specific zinc binding site. *J Mol Biol* **2006**, *362* (5), 1094-107.
100. Prassas, I.; Eissa, A.; Poda, G.; Diamandis, E. P., Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14* (3), 183-202.
101. Ohler, A.; Debela, M.; Wagner, S.; Magdolen, V.; Becker-Pauly, C., Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. *Biol Chem* **2010**, *391* (4), 455-60.
102. Emami, N.; Diamandis, E. P., Human kallikrein-related peptidase 14 (KLK14) is a new activator component of the KLK proteolytic cascade. Possible function in seminal plasma and skin. *J Biol Chem* **2008**, *283* (6), 3031-41.
103. Egelrud, T., Desquamation in the stratum corneum. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockholm)* **2000**, *208*, 44-5.

104. Hachem, J. P.; Man, M. Q.; Crumrine, D.; Uchida, Y.; Brown, B. E.; Rogiers, V.; Roseeuw, D.; Feingold, K. R.; Elias, P. M., Sustained serine proteases activity by prolonged increase in pH leads to degradation of lipid processing enzymes and profound alterations of barrier function and stratum corneum integrity. *J Invest Dermatol* **2005**, *125* (3), 510-20.
105. Caubet, C.; Jonca, N.; Brattsand, M.; Guerrin, M.; Bernard, D.; Schmidt, R.; Egelrud, T.; Simon, M.; Serre, G., Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol* **2004**, *122* (5), 1235-44.
106. Descargues, P.; Deraison, C.; Prost, C.; Fraitag, S.; Mazereeuw-Hautier, J.; D'Alessio, M.; Ishida-Yamamoto, A.; Bodemer, C.; Zambruno, G.; Hovnanian, A., Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. *J Invest Dermatol* **2006**, *126* (7), 1622-32.
107. Johnson, S. K.; Ramani, V. C.; Hennings, L.; Haun, R. S., Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin. *Cancer* **2007**, *109* (9), 1811-20.
108. Chan, A.; Godoy-Gijon, E.; Nuno-Gonzalez, A.; Crumrine, D.; Hupe, M.; Choi, E. H.; Gruber, R.; Williams, M. L.; Choate, K.; Fleckman, P. H.; Elias, P. M., Cellular basis of secondary infections and impaired desquamation in certain inherited ichthyoses. *JAMA dermatology* **2015**, *151* (3), 285-92.
109. Nylander-Lundqvist, E.; Egelrud, T., Formation of active IL-1 beta from pro-IL-1 beta catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro. *Acta Derm Venereol* **1997**, *77* (3), 203-6.
110. Brattsand, M.; Egelrud, T., Purification and characterization of interleukin 1 beta from human plantar stratum corneum. Evidence of interleukin 1 beta processing in vivo not involving interleukin 1 beta convertase. *Cytokine* **1998**, *10* (7), 506-13.
111. Yamasaki, K.; Schaubert, J.; Coda, A.; Lin, H.; Dorschner, R. A.; Schechter, N. M.; Bonnart, C.; Descargues, P.; Hovnanian, A.; Gallo, R. L., Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *Faseb j* **2006**, *20* (12), 2068-80.
112. Hovnanian, A., Netherton syndrome: skin inflammation and allergy by loss of protease inhibition. *Cell Tissue Res* **2013**, *351* (2), 289-300.
113. Cork, M. J.; Danby, S. G.; Vasilopoulos, Y.; Hadgraft, J.; Lane, M. E.; Moustafa, M.; Guy, R. H.; Macgowan, A. L.; Tazi-Ahnini, R.; Ward, S. J., Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **2009**, *129* (8), 1892-908.
114. Schechter, N. M.; Choi, E. J.; Wang, Z. M.; Hanakawa, Y.; Stanley, J. R.; Kang, Y.; Clayman, G. L.; Jayakumar, A., Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI). *Biol Chem* **2005**, *386* (11), 1173-84.
115. Egelrud, T.; Brattsand, M.; Kreutzmann, P.; Walden, M.; Vitzithum, K.; Marx, U. C.; Forssmann, W. G.; Magert, H. J., hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. *Br J Dermatol* **2005**, *153* (6), 1200-3.
116. Deraison, C.; Bonnart, C.; Lopez, F.; Besson, C.; Robinson, R.; Jayakumar, A.; Wagberg, F.; Brattsand, M.; Hachem, J. P.; Leonardsson, G.; Hovnanian, A., LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol Biol Cell* **2007**, *18* (9), 3607-19.

117. Hachem, J. P.; Wagberg, F.; Schmuth, M.; Crumrine, D.; Lissens, W.; Jayakumar, A.; Houben, E.; Mauro, T. M.; Leonardsson, G.; Brattsand, M.; Egelrud, T.; Roseeuw, D.; Clayman, G. L.; Feingold, K. R.; Williams, M. L.; Elias, P. M., Serine protease activity and residual LEKTI expression determine phenotype in Netherton syndrome. *J Invest Dermatol* **2006**, *126* (7), 1609-21.
118. Komatsu, N.; Saijoh, K.; Kuk, C.; Liu, A. C.; Khan, S.; Shirasaki, F.; Takehara, K.; Diamandis, E. P., Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Exp Dermatol* **2007**, *16* (6), 513-9.
119. Beljan, G.; Traupe, H.; Metze, D.; Sunderkotter, C., [Comel-Netherton syndrome with bacterial superinfection]. *Hautarzt* **2003**, *54* (12), 1198-202.
120. Walley, A. J.; Chavanas, S.; Moffatt, M. F.; Esnouf, R. M.; Ubhi, B.; Lawrence, R.; Wong, K.; Abecasis, G. R.; Jones, E. Y.; Harper, J. I.; Hovnanian, A.; Cookson, W. O., Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat Genet* **2001**, *29* (2), 175-8.
121. Kabesch, M.; Carr, D.; Weiland, S. K.; von Mutius, E., Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample. *Clin Exp Allergy* **2004**, *34* (3), 340-5.
122. Meyer-Hoffert, U., Reddish, scaly, and itchy: how proteases and their inhibitors contribute to inflammatory skin diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **2009**, *57* (5), 345-54.
123. Tanaka, R. J.; Ono, M.; Harrington, H. A., Skin barrier homeostasis in atopic dermatitis: feedback regulation of kallikrein activity. *PLoS One* **2011**, *6* (5), e19895.
124. Callard, R. E.; Harper, J. I., The skin barrier, atopic dermatitis and allergy: a role for Langerhans cells? *Trends Immunol* **2007**, *28* (7), 294-8.
125. Roedl, D.; Traidl-Hoffmann, C.; Ring, J.; Behrendt, H.; Braun-Falco, M., Serine protease inhibitor lymphoepithelial Kazal type-related inhibitor tends to be decreased in atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **2009**, *23* (11), 1263-6.
126. Choi, S. J.; Song, M. G.; Sung, W. T.; Lee, D. Y.; Lee, J. H.; Lee, E. S.; Yang, J. M., Comparison of transepidermal water loss, capacitance and pH values in the skin between intrinsic and extrinsic atopic dermatitis patients. *J Korean Med Sci* **2003**, *18* (1), 93-6.
127. Arama, D. P.; Soualmia, F.; Lisowski, V.; Longevial, J. F.; Bosc, E.; Maillard, L. T.; Martinez, J.; Masurier, N.; El Amri, C., Pyrido-imidazodiazepinones as a new class of reversible inhibitors of human kallikrein 7. *Eur J Med Chem* **2015**, *93*, 202-13.
128. Gupta, G. P.; Massague, J., Cancer metastasis: building a framework. *Cell* **2006**, *127* (4), 679-95.
129. Ramani, V. C.; Haun, R. S., The extracellular matrix protein fibronectin is a substrate for kallikrein 7. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *369* (4), 1169-73.
130. Talieri, M.; Diamandis, E. P.; Gourgiotis, D.; Mathioudaki, K.; Scorilas, A., Expression analysis of the human kallikrein 7 (KLK7) in breast tumors: a new potential biomarker for prognosis of breast carcinoma. *Thromb Haemost* **2004**, *91* (1), 180-6.

131. Psyrris, A.; Kountourakis, P.; Scorilas, A.; Markakis, S.; Camp, R.; Kowalski, D.; Diamandis, E. P.; Dimopoulos, M. A., Human tissue kallikrein 7, a novel biomarker for advanced ovarian carcinoma using a novel in situ quantitative method of protein expression. *Ann Oncol* **2008**, *19* (7), 1271-7.
132. Li, W.; Zhao, Y.; Ren, L.; Wu, X., Serum human kallikrein 7 represents a new marker for cervical cancer. *Med Oncol* **2014**, *31* (10), 208.
133. Ramani, V. C.; Hennings, L.; Haun, R. S., Desmoglein 2 is a substrate of kallikrein 7 in pancreatic cancer. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 373.
134. Mo, L.; Zhang, J.; Shi, J.; Xuan, Q.; Yang, X.; Qin, M.; Lee, C.; Klocker, H.; Li, Q. Q.; Mo, Z., Human kallikrein 7 induces epithelial-mesenchymal transition-like changes in prostate carcinoma cells: a role in prostate cancer invasion and progression. *Anticancer Res* **2010**, *30* (9), 3413-20.
135. Prezas, P.; Arlt, M. J.; Viktorov, P.; Soosaipillai, A.; Holzscheiter, L.; Schmitt, M.; Talieri, M.; Diamandis, E. P.; Kruger, A.; Magdolen, V., Overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6, and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biol Chem* **2006**, *387* (6), 807-11.
136. Prezas, P.; Scorilas, A.; Yfanti, C.; Viktorov, P.; Agnanti, N.; Diamandis, E.; Talieri, M., The role of human tissue kallikreins 7 and 8 in intracranial malignancies. *Biol Chem* **2006**, *387* (12), 1607-12.
137. Talieri, M.; Mathioudaki, K.; Prezas, P.; Alexopoulou, D. K.; Diamandis, E. P.; Xynopoulos, D.; Ardavanis, A.; Arnogiannaki, N.; Scorilas, A., Clinical significance of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) in colorectal cancer. *Thromb Haemost* **2009**, *101* (4), 741-7.
138. Talieri, M.; Li, L.; Zheng, Y.; Alexopoulou, D. K.; Soosaipillai, A.; Scorilas, A.; Xynopoulos, D.; Diamandis, E. P., The use of kallikrein-related peptidases as adjuvant prognostic markers in colorectal cancer. *Br J Cancer* **2009**, *100* (10), 1659-65.
139. Termini, L.; Maciag, P. C.; Soares, F. A.; Nonogaki, S.; Pereira, S. M.; Alves, V. A.; Longatto-Filho, A.; Villa, L. L., Analysis of human kallikrein 7 expression as a potential biomarker in cervical neoplasia. *Int J Cancer* **2010**, *127* (2), 485-90.
140. Zhao, H.; Dong, Y.; Quan, J.; Smith, R.; Lam, A.; Weinstein, S.; Clements, J.; Johnson, N. W.; Gao, J., Correlation of the expression of human kallikrein-related peptidases 4 and 7 with the prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Head & neck* **2011**, *33* (4), 566-72.
141. Martins, W. K.; Esteves, G. H.; Almeida, O. M.; Rezze, G. G.; Landman, G.; Marques, S. M.; Carvalho, A. F.; LF, L. R.; Duprat, J. P.; Stolf, B. S., Gene network analyses point to the importance of human tissue kallikreins in melanoma progression. *BMC medical genomics* **2011**, *4*, 76.
142. Xuan, Q.; Yang, X.; Mo, L.; Huang, F.; Pang, Y.; Qin, M.; Chen, Z.; He, M.; Wang, Q.; Mo, Z. N., Expression of the serine protease kallikrein 7 and its inhibitor antileukoprotease is decreased in prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med* **2008**, *132* (11), 1796-801.
143. Planque, C.; de Monte, M.; Guyetant, S.; Rollin, J.; Desmazes, C.; Panel, V.; Lemarie, E.; Courty, Y., KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *329* (4), 1260-6.

144. Pampalakis, G.; Sotiropoulou, G., Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1776* (1), 22-31.
145. Goettig, P.; Magdolen, V.; Brandstetter, H., Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie* **2010**, *92* (11), 1546-67.
146. Angelo, P. F.; Lima, A. R.; Alves, F. M.; Blaber, S. I.; Scarisbrick, I. A.; Blaber, M.; Juliano, L.; Juliano, M. A., Substrate specificity of human kallikrein 6: salt and glycosaminoglycan activation effects. *J Biol Chem* **2006**, *281* (6), 3116-26.
147. Kishi, T.; Cloutier, S. M.; Kundig, C.; Deperthes, D.; Diamandis, E. P., Activation and enzymatic characterization of recombinant human kallikrein 8. *Biol Chem* **2006**, *387* (6), 723-31.
148. Lansdown, A. B.; Mirastschijski, U.; Stubbs, N.; Scanlon, E.; Agren, M. S., Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen* **2007**, *15* (1), 2-16.
149. Potempa, J.; Korzus, E.; Travis, J., The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* **1994**, *269* (23), 15957-60.
150. Engh, R. A.; Huber, R.; Bode, W.; Schulze, A. J., Divining the serpin inhibition mechanism: a suicide substrate 'springe'? *Trends Biotechnol* **1995**, *13* (12), 503-10.
151. Emami, N.; Diamandis, E. P., New insights into the functional mechanisms and clinical applications of the kallikrein-related peptidase family. *Molecular oncology* **2007**, *1* (3), 269-87.
152. Luo, L. Y.; Jiang, W., Inhibition profiles of human tissue kallikreins by serine protease inhibitors. *Biol Chem* **2006**, *387* (6), 813-6.
153. Geiger, R.; Konig, G.; Fruhmman, G., Inhibition of human tissue (urinary) kallikrein by sera of patients suffering from hereditary alpha 1-antitrypsin (alpha 1-proteinase inhibitor) deficiency. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **1981**, *362* (7), 1013-5.
154. Zhang, W. M.; Leinonen, J.; Kalkkinen, N.; Stenman, U. H., Prostate-specific antigen forms a complex with and cleaves alpha 1-protease inhibitor in vitro. *Prostate* **1997**, *33* (2), 87-96.
155. Zhou, G. X.; Chao, L.; Chao, J., Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence. *J Biol Chem* **1992**, *267* (36), 25873-80.
156. Magert, H. J.; Standker, L.; Kreutzmann, P.; Zucht, H. D.; Reinecke, M.; Sommerhoff, C. P.; Fritz, H.; Forssmann, W. G., LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* **1999**, *274* (31), 21499-502.
157. Chavanas, S.; Bodemer, C.; Rochat, A.; Hamel-Teillac, D.; Ali, M.; Irvine, A. D.; Bonafe, J. L.; Wilkinson, J.; Taieb, A.; Barrandon, Y.; Harper, J. I.; de Prost, Y.; Hovnanian, A., Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet* **2000**, *25* (2), 141-2.
158. Komatsu, N.; Saijoh, K.; Jayakumar, A.; Clayman, G. L.; Tohyama, M.; Suga, Y.; Mizuno, Y.; Tsukamoto, K.; Taniuchi, K.; Takehara, K.; Diamandis, E. P., Correlation between SPINK5 gene mutations and clinical manifestations in Netherton syndrome patients. *J Invest Dermatol* **2008**, *128* (5), 1148-59.

159. Lauber, T.; Schulz, A.; Schweimer, K.; Adermann, K.; Marx, U. C., Homologous proteins with different folds: the three-dimensional structures of domains 1 and 6 of the multiple Kazal-type inhibitor LEKTI. *J Mol Biol* **2003**, *328* (1), 205-19.
160. Tan, X.; Furio, L.; Reboud-Ravaux, M.; Villoutreix, B. O.; Hovnanian, A.; El Amri, C., 1,2,4-Triazole derivatives as transient inactivators of kallikreins involved in skin diseases. *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, *23* (16), 4547-51.
161. Freitas, R. F.; Teixeira, T. S.; Barros, T. G.; Santos, J. A.; Kondo, M. Y.; Juliano, M. A.; Juliano, L.; Blaber, M.; Antunes, O. A.; Abrahao, O., Jr.; Pinheiro, S.; Muri, E. M.; Puzer, L., Isomannide derivatives as new class of inhibitors for human kallikrein 7. *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22* (19), 6072-5.
162. Oliveira, J. P.; Freitas, R. F.; Melo, L. S.; Barros, T. G.; Santos, J. A.; Juliano, M. A.; Pinheiro, S.; Blaber, M.; Juliano, L.; Muri, E. M.; Puzer, L., Isomannide-based peptidomimetics as inhibitors for human tissue kallikreins 5 and 7. *ACS Med Chem Lett* **2014**, *5* (2), 128-32.
163. Arama, D. P.; Soualmia, F.; Lisowski, V.; Longevial, J. F.; Bosc, E.; Maillard, L. T.; Martinez, J.; Masurier, N.; El Amri, C., Pyrdo-imidazodiazepinones as a new class of reversible inhibitors of human kallikrein 7. *Eur J Med Chem* **2015**, *93c*, 202-213.
164. Flohr, S. R., S. A.; Ostermann, N.; Hassiepen, U.; Berst, F.; Bodendorf, U.; Gerhartz, B.; Marzinik, A.; Ehrhardt, C.; Meingassner, J. G.; Kallikrein 7 modulators. WO 2009/000878 A1.
165. Krastel, P. L., B. M.; Schmitt, E.; Schreiner, E. P.; Use of cyclic depsipetides to inhibit kallikrein 7. WO 2009/024528 A1.
166. Maiwald, A.; Hammami, M.; Wagner, S.; Heine, A.; Klebe, G.; Steinmetzer, T., Changing the selectivity profile - from substrate analog inhibitors of thrombin and factor Xa to potent matriptase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2016**, *31* (sup1), 89-97.
167. Tziridis, A.; Rauh, D.; Neumann, P.; Kolenko, P.; Menzel, A.; Brauer, U.; Ursel, C.; Steinmetzer, P.; Stürzebecher, J.; Schweinitz, A.; Steinmetzer, T.; Stubbs, M. T., Correlating structure and ligand affinity in drug discovery: a cautionary tale involving second shell residues. *Biol Chem* **2014**, *395* (7-8), 891-903.
168. Kauer, J., p-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. Photolabeling of calmodulin with a synthetic calmodulin-binding peptide. *J Biol Chem* **1986**, *261* (23), 10695-10700.
169. Steinmetzer, T.; Baum, B.; Biela, A.; Klebe, G.; Nowak, G.; Bucha, E., Beyond heparinization: design of highly potent thrombin inhibitors suitable for surface coupling. *ChemMedChem* **2012**, *7* (11), 1965-73.
170. Baron, J.; Tarnow, C.; Mayoli-Nussle, D.; Schilling, E.; Meyer, D.; Hammami, M.; Schwalm, F.; Steinmetzer, T.; Guan, Y.; Garten, W.; Klenk, H. D.; Bottcher-Friebertshauser, E., Matriptase, HAT, and TMPRSS2 activate the hemagglutinin of H9N2 influenza A viruses. *J Virol* **2013**, *87* (3), 1811-20.
171. Stürzebecher, J.; Steinmetzer, T.; Schweinitz, A. Synthesis of guanidinybenzene-deriv. dipeptide conjugate urokinase inhibitors as pharmaceuticals for use in the treatment or diagnosis of metastatic tumors. WO 2003/076391 A2.
172. Steinmetzer, T., Synthetic urokinase inhibitors as potential antitumor drugs. *IDrugs* **2003**, *6* (2), 138-46.

173. Künzel, S.; Schweinitz, A.; Reissmann, S.; Stürzebecher, J.; Steinmetzer, T., 4-amidinobenzylamine-based inhibitors of urokinase. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12* (4), 645-8.
174. Steinmetzer, T.; Schweinitz, A.; Stürzebecher, J.; Steinmetzer, P.; Söffing, A.; Van de Locht, A.; Nicklisch, S.; Reichelt, C.; Ludwig, F.-A.; Schulze, A.; Daghisch, M.; Heinicke, J. Trypsin-like serine proteases and their preparation and use. WO 2008/049595.
175. Saupe, S. M.; Leubner, S.; Betz, M.; Klebe, G.; Steinmetzer, T., Development of new cyclic plasmin inhibitors with excellent potency and selectivity. *J Med Chem* **2013**, *56* (3), 820-31.
176. Tucker, T. J.; Brady, S. F.; Lumma, W. C.; Lewis, S. D.; Gardell, S. J.; Naylor-Olsen, A. M.; Yan, Y.; Sisko, J. T.; Stauffer, K. J.; Lucas, B. J.; Lynch, J. J.; Cook, J. J.; Stranieri, M. T.; Holahan, M. A.; Lyle, E. A.; Baskin, E. P.; Chen, I. W.; Dancheck, K. B.; Krueger, J. A.; Cooper, C. M.; Vacca, J. P., Design and synthesis of a series of potent and orally bioavailable noncovalent thrombin inhibitors that utilize nonbasic groups in the P1 position. *J Med Chem* **1998**, *41* (17), 3210-9.
177. Nazare, M.; Matter, H.; Klingler, O.; Al-Obeidi, F.; Schreuder, H.; Zoller, G.; Czech, J.; Lorenz, M.; Dudda, A.; Peyman, A.; Nestler, H. P.; Urmann, M.; Bauer, A.; Laux, V.; Wehner, V.; Will, D. W., Novel factor Xa inhibitors based on a benzoic acid scaffold and incorporating a neutral P1 ligand. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, *14* (11), 2801-5.
178. Matter, H.; Will, D. W.; Nazare, M.; Schreuder, H.; Laux, V.; Wehner, V., Structural requirements for factor Xa inhibition by 3-oxybenzamides with neutral P1 substituents: combining X-ray crystallography, 3D-QSAR, and tailored scoring functions. *J Med Chem* **2005**, *48* (9), 3290-312.
179. Matter, H.; Nazare, M.; Gussregen, S.; Will, D. W.; Schreuder, H.; Bauer, A.; Urmann, M.; Ritter, K.; Wagner, M.; Wehner, V., Evidence for C-Cl/C-Br... π interactions as an important contribution to protein-ligand binding affinity. *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48* (16), 2911-6.
180. Nazare, M.; Will, D. W.; Matter, H.; Schreuder, H.; Ritter, K.; Urmann, M.; Essrich, M.; Bauer, A.; Wagner, M.; Czech, J.; Lorenz, M.; Laux, V.; Wehner, V., Probing the subpockets of factor Xa reveals two binding modes for inhibitors based on a 2-carboxyindole scaffold: a study combining structure-activity relationship and X-ray crystallography. *J Med Chem* **2005**, *48* (14), 4511-25.
181. Roehrig, S.; Straub, A.; Pohlmann, J.; Lampe, T.; Pernerstorfer, J.; Schlemmer, K. H.; Reinemer, P.; Perzborn, E., Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. *J Med Chem* **2005**, *48* (19), 5900-8.
182. Dixon, M., The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* **1953**, *55* (1), 170-1.
183. Rezaie, A. R.; Yang, L., Deletion of the 60-loop provides new insights into the substrate and inhibitor specificity of thrombin. *Thromb Haemost* **2005**, *93* (6), 1047-54.

184. Stürzebecher, A.; Donnecke, D.; Schweinitz, A.; Schuster, O.; Steinmetzer, P.; Stürzebecher, U.; Kotthaus, J.; Clement, B.; Stürzebecher, J.; Steinmetzer, T., Highly potent and selective substrate analogue factor Xa inhibitors containing D-homophenylalanine analogues as P3 residue: part 2. *ChemMedChem* **2007**, *2* (7), 1043-53.
185. Dönnecke, D.; Schweinitz, A.; Stürzebecher, A.; Steinmetzer, P.; Schuster, M.; Stürzebecher, U.; Nicklisch, S.; Stürzebecher, J.; Steinmetzer, T., From selective substrate analogue factor Xa inhibitors to dual inhibitors of thrombin and factor Xa. Part 3. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17* (12), 3322-9.
186. Nantermet, P. G.; Barrow, J. C.; Newton, C. L.; Pellicore, J. M.; Young, M.; Lewis, S. D.; Lucas, B. J.; Krueger, J. A.; McMasters, D. R.; Yan, Y.; Kuo, L. C.; Vacca, J. P.; Selnick, H. G., Design and synthesis of potent and selective macrocyclic thrombin inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, *13* (16), 2781-4.
187. Richter, J. M.; Cheney, D. L.; Bates, J. A.; Wei, A.; Luetttgen, J. M.; Rendina, A. R.; Harper, T. M.; Narayanan, R.; Wong, P. C.; Seiffert, D.; Wexler, R. R.; Priestley, E. S., Design and Synthesis of Novel Meta-Linked Phenylglycine Macrocyclic FVIIa Inhibitors. *ACS Med Chem Lett* **2017**, *8* (1), 67-72.
188. Corte, J. R.; Fang, T.; Osuna, H.; Pinto, D. J.; Rossi, K. A.; Myers, J. E., Jr.; Sheriff, S.; Lou, Z.; Zheng, J. J.; Harper, T. W.; Bozarth, J. M.; Wu, Y.; Luetttgen, J. M.; Seiffert, D. A.; Decicco, C. P.; Wexler, R. R.; Quan, M. L., Structure-Based Design of Macrocyclic Factor XIa Inhibitors: Discovery of the Macrocyclic Amide Linker. *J Med Chem* **2017**, *60* (3), 1060-1075.
189. Schweinitz, A.; Dönnecke, D.; Ludwig, A.; Steinmetzer, P.; Schulze, A.; Kotthaus, J.; Wein, S.; Clement, B.; Steinmetzer, T., Incorporation of neutral C-terminal residues in 3-amidinophenylalanine-derived matriptase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19* (7), 1960-5.
190. Stürzebecher, J.; Prasa, D.; Hauptmann, J.; Vieweg, H.; Wikström, P., Synthesis and structure-activity relationships of potent thrombin inhibitors: piperazides of 3-amidinophenylalanine. *J Med Chem* **1997**, *40* (19), 3091-9.
191. Han, Z.; Harris, P. K.; Jones, D. E.; Chugani, R.; Kim, T.; Agarwal, M.; Shen, W.; Wildman, S. A.; Janetka, J. W., Inhibitors of HGFA, Matriptase, and Hepsin Serine Proteases: A Nonkinase Strategy to Block Cell Signaling in Cancer. *ACS Med Chem Lett* **2014**, *5* (11), 1219-24.
192. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A., NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J Org Chem* **1997**, *62* (21), 7512-7515.
193. Meyer, D.; Sielaff, F.; Hammami, M.; Böttcher-Friebertshäuser, E.; Garten, W.; Steinmetzer, T., Identification of the first synthetic inhibitors of the type II transmembrane serine protease TMPRSS2 suitable for inhibition of influenza virus activation. *Biochem J* **2013**, *452* (2), 331-43.
194. Stüber, W.; Koschinsky, R.; Reers, M.; Hoffmann, D.; Czech, J.; Dickneite, G., Preparation and evaluation of PEG-bound thrombin inhibitors based on 4-amidinophenylalanine. *Pept Res* **1995**, *8* (2), 78-85.
195. Judkins, B. D., A Versatile Synthesis of Amidines from Nitriles Via Amidoximes. *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry* **1996**, *26* (23), 4351-4367.

196. Yeo, S. J.; Kim, S. J.; Kim, J. H.; Lee, H. J.; Kook, Y. H., Influenza A virus infection modulates the expression of type IV collagenase in epithelial cells. *Arch Virol* **1999**, *144* (7), 1361-70.
197. Moroder, L., Di-tert.-butyldicarbonat - ein vorteilhaftes Reagenz zur Einführung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* **1976**, *357*, 1651-1653.
198. Paul E. Fleming, Z. S., Brendan S. Chen, Jane F. Schmidt, John C. Reader, Neal D. Hone, Jeffrey P. Ciavarri 2-(amino-substituted)-4-aryl pyrimidines and related compounds useful for treating inflammatory diseases. PCT/US2005/000663, 2005.
199. Kloek, J. A.; Leschinsky, K. L., An improved synthesis of sulfamoyl chlorides. *The Journal of Organic Chemistry* **1976**, *41* (25), 4028-4029.
200. G. Schwarz, H. A., H.R. Krichelsdorf, Syntheses and Reactions of (Trismethylsilyloxy)benzoyl Chlorides. *Liebigs. Ann. Chem.* **1981**, *1981* (7), 1257-1270.
201. Marusawa, H.; Setoi, H.; Sawada, A.; Kuroda, A.; Seki, J.; Motoyama, Y.; Tanaka, H., Synthesis and biological activity of 1-phenylsulfonyl-4-phenylsulfonylaminopyrrolidine derivatives as thromboxane a(2) receptor antagonists. *Bioorg Med Chem* **2002**, *10* (5), 1399-415.
202. Wennemers, H.; Conza, M.; Nold, M.; Krattiger, P., Diketopiperazine receptors: a novel class of highly selective receptors for binding small peptides. *Chemistry* **2001**, *7* (15), 3342-7.
203. Johnson, T. B., Hill, A.J., Researches on pyrimidines. LXVII. The condensation of thiourea with ethyl allylacetoacetate. *J. Am. Chem. Soc.* **1914**, *36* (2), 364-372.
204. Koo, L. MELANOCORTIN RECEPTOR AGONISTS. US 2010/0120783 A1 2011.
205. Gao, Y., Facile Synthesis of New L-Arginine Derivatives as Substrates for Trypsin-Like Proteases. *Synth Comm* **2004**, *34* (19), 3465-3471.
206. Rijkers, D., A convenient synthesis of amino acid p-nitroanilides; synthons in the synthesis of protease substrates. *Tetrahedron* **1995**, *51* (41), 11235-11250.
207. Jacobson, K. A.; Kirk, K. L.; Padgett, W. L.; Daly, J. W., A functionalized congener approach to adenosine receptor antagonists: amino acid conjugates of 1,3-dipropylxanthine. *Mol Pharmacol* **1986**, *29* (2), 126-33.

7 Danksagung

Prof. Dr. Torsten Steinmetzer danke ich herzlichst für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die sehr gute Betreuung.

Bei Professor Andreas Heine bedanke ich mich für die Bereitschaft das Zweitgutachten dieser Arbeit zu übernehmen.

Bei Professor Dr. Keck und Professor Dr. Kockskaemper möchte ich mich für die Bereitschaft zur Mitwirkung an der Prüfungskommission bedanken.

Bei Professor Dr. Cornlia Keck möchte ich mich für die Bereitschaft zur Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission bedanken.

Bei Professor Dr. Viktor Magdolen bedanke ich mich für die Bereitstellung des KLK7.

Dr. Kornelia Harges danke ich für die Bereitschaft als Protokollantin an meiner Prüfung teilzunehmen.

Dr. Kornelia Harges, Heike Lang-Henkel, Teodora Ivanova, Aline Keils, Jenny Kouretova, Dr. Wegderes Endreas, Anton Epp, Dominik Felix, Benjamin Wenzel und Andre Wuttke möchte ich für die Zusammenarbeit danken.

Nina Zitzer möchte ich für die Aufnahme der Massenspektren danken.

Teodora Ivanova und Dr. Patrick Trutzel danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Marcel Göde danke ich für die persönliche Unterstützung.

Für die Unterstützung möchte ich mich bei meiner Mutter, Heidrun Maiwald, bedanken.

8 Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Alexander Maiwald
Geburtsdatum: 05.11.1981
Geburtsort: Lutherstadt Wittenberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

AUSBILDUNG

Seit 01/2012 Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps Universität Marburg, Arbeitskreis Prof. Dr. Steinmetzer
01/2011 - 09/2011 Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Pharmazie, Johannes Gutenberg Universität Mainz
04/2004 – 12/2010 Studium der Biomedizinischen Chemie, Johannes Gutenberg Universität Mainz
09/2001 – 01/2004 Ausbildung zum Chemielaboranten, Clariant GmbH, Frankfurt am Main
09/1992 – 06/2000 Melanchthon Gymnasium Wittenberg; Abitur

Wehrdienst

07/2000 – 04/2001 ABC-Abwehrbataillon 805 Prenzlau

9 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Synthese und Charakterisierung neuer substratanaloger Inhibitoren der Serinproteasen Matriptase und Kallikrein 7“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....
(Unterschrift mit Vor- und Zuname)